

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

**Läänemere pinnavee ja setete mikroobide mitmekesisus külmal perioodil:  
naftasaaduste lagundamise kataboolne potentsiaal**

Bakalaureusetöö

Lõputöö maht (12 EAP)

Kevin Liivapuu

Juhendaja teadur Signe Viggor PhD

TARTU 2018

## Infoleht

### **Läänemere pinnavee ja setete mikroobide mitmekesisus külmal perioodil: naftasaaduste lagundamise kataboolne potentsiaal**

Naftareostuse risk Läänemerel suureneb iga aastaga tiheneva laevaliikluse tõttu. Töös uuriti talvisel perioodil Läänemere pinnaveest ja setetest isoleeritud naftasaadusi lagundavaid baktereid ning mikroobikoosluste muutumist erinevatel temperatuuridel toornafta lisamisel. Analüüsil selgus, et erinevad keskkonnategurid (soolsus, temperatuur, alkaanide kontsentratsioon jne.) mõjutavad mikroobikoosluste koostist. 16S rRNA geeni fülogeneetilise analüüsi alusel domineerisid talvisel perioodil isoleeritud tüvede hulgas hõimkonnad *Proteobacteria* ja *Actinobacteria*. Leiti, et Läänemere bakterid on võimelised lagundama erinevaid alifaatseid ja aromaatsid süsivesinikke ning nende lagundamiseks vajalik kataboolsete geenide hulk ja mitmekesisus on suur.

Märksõnad: Läänemeri, bakterid, naftasaaduste lagundamine, kooslused, kataboolsed geenid  
CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

### **Biodiversity of the Baltic Sea surface water and sediment bacteria during the cold period: catabolic potential of degradation of oil products**

The risk of oil pollution in the Baltic Sea is growing due to increased traffic in each year. In this study oil products degrading bacteria were isolated from the Baltic Sea surface water and sediment samples taken during the winter period. Effect of different environmental factors (salinity, temperature, concentration of alkanes etc.) on the bacterial community composition was considered. The microcosm experiments at different temperatures and with addition of crude oil were conducted. The results showed that different environmental factors had a significant influence on the bacterial communities. Based on the phylogenetic analysis of the 16S rRNA genes of isolates in the winter period samples revealed the domination of phyla *Proteobacteria* and *Actinobacteria*. The number of detected catabolic genes in isolates is high, they are phylogenetically different. That reveals the good catabolic potential of the Baltic Sea bacterial communities in degradation of crude oil .

Keywords: Baltic Sea, bacteria, degradation of oil products, communities, catabolic genes  
CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

# Sisukord

KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Läänemeri .....	7
1.2 Reostus kui Läänemere peamine oht .....	8
1.2.1 Reostus Läänemeres .....	8
1.2.2 Laevaliiklus Läänemereel .....	8
1.2.3 HELCOM .....	9
1.3 Toornafta .....	9
1.4 Bakterite roll naftasaaduste lagundamisel .....	10
1.4.1 Alkaanide lagundamine .....	10
1.4.2 Aromaatsete ühendite lagundamine .....	12
1.5. Läänemere mikroobikooslused.....	15
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	20
2.1 Töö eesmärgid .....	20
2.2 Materjal ja metoodika.....	20
2.2.1 Veeproovide võtmine, filtreerimine ja DNA eraldamine .....	20
2.2.2 Mikrokosmid ja bakteritüvede isoleerimine .....	20
2.2.3 Geenifragmentide amplifitseerimine .....	21
2.2.4 Geelelektroforees.....	23
2.2.5 Sekveneerimine .....	23
2.2.6 Sekveneeritud järjestuste analüüs .....	23
2.2.7 Denatureeriva gradiendiga geelelektroforees (DGGE) .....	24
2.2.8 Geenifragmendi klooniraamatukogude koostamine.....	24
2.3 Tulemused ja arutelu .....	26
2.3.1 Proovipunktide kirjeldus .....	26
2.3.2 Toornafta ja temperatuuri mõju mikrokosmide bakterikooslustele - 16S rRNA	

geenifragmendi järjestuste DGGE profiilide analüüs.....	31
2.3.3 Tüvede isoleerimine ja identifitseerimine .....	34
2.3.4 Alkaanide lagundamisel osalevate võtmeensüümide tuvastamine .....	37
2.3.5 Aromaatsete ühendite lagundamisel osalevate võtmeensüümide tuvastamine .....	44
KOKKUVÕTE .....	48
Summary.....	49
KIRJANDUSE LOETELU.....	50
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	59
LISAD Lisa 1 .....	60
Lisa 2 .....	61
Lisa 3 .....	62
Lisa 4A .....	63
Lisa 4B.....	64
Lisa 5A .....	65
Lisa 5B.....	66
Lisa 6 .....	67
Lisa 7 .....	68
Lisa 8 .....	69

## KASUTATUD LÜHENDID

ah - aminohape

AlkB - membraaniseoseline alkaani hüdroksülaas

ap - aluspaar (*base pair*)

C12O - katehhooli 1,2-dioksügenaas

C23O - katehhooli 2,3-dioksügenaas

DGGE - denatureeriva gradiendiga geelelektroforees

HELCOM - Läänemere merekeskkonna kaitse komisjon ehk Helsingi komisjon

LmPH - multikomponentse fenooli hüdroksülaasi suur subühik

P34O - protokatehhuaadi 3,4-dioksügenaas

PCR - polümeraasi ahelreaktsioon

PHE - fenool

SAL - salitsülaad

TN - toornafta

## SISSEJUHATUS

Läänemerd iseloomustab tihe inimasustus rannikualadel, aktiivne laevaliiklus merel ja unikaalne ökosüsteem, mis muudab selle ainulaadseks veekoguks võrreldes teiste maailmameredega. Kahjuks loetakse Läänemerd ka üheks enim saastatumaks mereks maailmas. Tõsiseks reostusallikaks peetakse tihedat laevaliiklust (igas kuus läbib Läänemerd kuni 5000 erinevat alust), mille käigus satub pidevalt vette toornaftat läbi juhuslike lekete. Lisaks mereäärsele kaubandustegevusele ja merel toimuvale liiklusele, koormab Läänemerd suure hulga jõgede suubumine merre, mis kannavad kaasa maismaalt pärit põllumajanduslikke kemikaale nagu lämmastik, fosfor, erinevad herbitsiidid ja antibakteriaalsed ained kui ka tööstuslikud kemikaalid nagu naftasaadused ja fenoolsed ühendid. Samuti muudab suure hulga magevee sissevool Läänemere riimveeliseks ning mõjutab oluliselt mere soolsust, mistõttu on see teiste maailmameredega võrreldes tunduvalt magedam.

Merel ja rannikualadel toimuv vilgas majandustegevus pakub kohalikele elanikele hulgaliselt töökohti, mis muudab Läänemere saastatuse aktuaalseks probleemiks ja oluliseks keskkonnariskiks. Hetkel on vaid võimalik ennustada, millist ökoloogilist katastroofi põhjustaks mõne suure naftatankeri või sadama õnnetus.

Bakteritel on tähtis roll erinevate kemikaalide lagundamisel mere keskkonnas. Praeguseks on teada, millised on peamised hõimkonnad Läänemere mikroobikoosluses ning kuidas nende osakaalud muutuvad erinevate keskkonna tegurite mõjul. Enamus uurimustöid on keskendunud soojal perioodil kogutud proovidest koosluste iseloomustamisele, kuid vähem on uuritud talviseid kooslusi.

Käesoleva töö eesmärgiks on iseloomustada naftasaadusi lagundavaid baktereid, kes on isoleeritud Läänemere setetest ja pinnaveest võetud proovidest külmal perioodil. Uurida, kuidas mõjutavad erinevad keskkonnategurid (vee soolsus, temperatuur jne.) sealset mikroobikooslust, et paremini mõista selles toimuvaid muutusi ning mikroobide reageerimist reostusele. Sellepärast on oluline uurida naftasaaduste bioloogilist lagunemist ja selles osalevaid baktereid ning nende kataboolseid ensüüme, et tulevikus töötada välja strateegiaid naftareostuste bioloogiliseks likvideerimiseks ehk bioaugmentatsiooniks.

Töö valmis projekti OILMICROB (ERA-NET RusPlus Programm) raames ning isoleeritud tüved säilitatakse Haridus- ja teadusministeeriumi poolt rahastatavas looduslike ja laboratoorsete mikroobitüvede kollektsioonis CELMS (RLTMRCELMS).

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Läänemeri

Läänemeri on noor ja väga ainulaadne veekogu oma bioloogiliste, geokeemiliste ja füüsikaliste omaduste poolest (Reunamo, 2015) olles maailma suuruselt teine riimveekogu, millest suurem on vaid Must meri. Läänemere pindala on 377 000 km<sup>2</sup>, koos Taani väinade ja Kattegatiga 415 000 km<sup>2</sup> (Riemann *et al.*, 2008).

Mõtteliselt võib Läänemere jagada kaheks osaks – põhjaosaks ja Ava-Läänemereks. Põhjaosa moodustavad Botnia laht ja Botnia meri ning Soome laht. Ava-Läänemeri jaguneb põhja- ja lõunaosaks ning Lääne- ja Ida-Gotlandi basseiniks. Ainsa ühenduse maailmamerega tagavad kitsad Taani väinad – madalamates osades jääb sügavus ainult 8-18 meetri vahele, mistõttu loetakse Läänemerd poolkinniseks mereks. Seetõttu on soolase merevee sissevool piiratud – umbes 475 km<sup>3</sup> aastas. Samaaegselt toimub riimvee väljavool Põhjamerre, mis moodustab ligikaudu 940 km<sup>3</sup> ning maismaalt lisandub pidevalt magevett (ca 660 km<sup>3</sup> aastas) enam kui 250 jõest (Ruskule *et al.*, 2009). Need samaaegselt toimuvad protsessid loovad riimveelised tingimused, kus keskmine soolsus Taani väinades on 10–35‰, Läänemere avaosas 6–8‰ ning väheneb Soome ja Põhjalahe sopi suunas, jäädes vahemikku 3–6‰, mis on ookeani soolsusega (umbes 35‰) võrreldes väga madal (Sjöqvist *et al.*, 2015)

Riimvee väljavool toimub pinnakihi, samaaegselt voolab soolasem vesi sisse pinnaaluses veekihi, mille tulemusena on vesi selgepiirilisel kihistunud soolsuse gradiendi järgi, jagunedes madalama soolsusega pinnakihtideks ning suhteliselt suure soolsusega süvakihtideks (Ruskule *et al.*, 2009). Nende kahe erineva soolsusega kihi vahele jäävat õhukest veekihti, nimetatakse soolsushüppekihiks ehk halokliiniks, mis eraldab madalama soolsusega pinnavee kihte umbes 70 – 100 meetri sügavusel, kust alates soolsus põhja suunas muutub väga järsult (Ojaveer *et al.*, 2010) Peale selle toimub kihistumine ka külmema põhjavee ja soojema pinnavee vahel, mis tekitab termokliini. Kihistumine takistab hapnikurikka pinnavee segunemist põhjaveega, mis tekitab sügavamates kihtides hapnikuvaba keskkonna. Selle tulemusena jäävad saaste- ja toitained põhjakihtidesse lõksu, tekitades „surnud tsoone”, mis moodustavad kuni neljandiku Läänemere põhjast. Säärastes karmides tingimustes elamine on enamikele mereorganismidele raske katsumus (Ruskule *et al.*, 2009).

Riimveeline keskkond, aeglane veevahetus Põhjamerre ning lühike geoloogiline ajalugu (umbes 10 000 aastat) on tinginud eukarüootsete organismide väikese liigilise koosseisu vastupidiselt prokarüootidele (Paavola *et al.*, 2005). Bakterite võime kiiresti paljuneda on

andnud neile evolutsioonilise eelise kohastuda nende tingimustega lühikese aja jooksul, muutes mikroorganismide kooslused väga mitmekesiseks (Herlemann *et al.*, 2016).

Taolises noores ja muutavas ökosüsteemis, kus bioloogiline mitmekesisus ei ole eriti rikkalik, kannab iga liik oma rolli kogu süsteemistruktuuri ja dünaamika säilitamisel. Seega võib ühe liigi kadumine põhjustada kogu struktuurile pöördumatut kahju, sest ükski teine liik ei ole võimeline teda asendama. See muudab Läänemere väga ainulaadseks, kuid samal ajal hapraks ökosüsteemiks, mis on erinevate keskkonna muutuste ja reostuste suhtes väga tundlik. Kahjuks on Läänemeri nimetatud kõige saastatumate merede hulka maailmas (Ruskule *et al.*, 2009).

## **1.2 Reostus kui Läänemere peamine oht**

### **1.2.1 Reostus Läänemeres**

Kõige suurem ökoloogiline probleem Läänemeres on eutrofeerumine. Kõrge toitainete kontsentratsioon põhjustab vetikate vohamist ning tekib orgaanilise aine ületootmine, mis viib kogu ökosüsteemi tasakaalust välja. Kõige ilmekam näide eutrofeerumisest on vetikate õitsemine suvel suurtel merealadel (Ruskule *et al.*, 2009).

Teine oluline probleem on inimtekkeliste ohtlike ainete (näiteks dioksiinid, polüklooritud bifenüülid, ravimijäägid, lõhkekehad, tööstusjäätised, elavhõbe ja pestitsiidid) sattumine mere ökosüsteemi. Mitmed kemikaalid akumulieruvad toiduahelas ning võivad põhjustada mereorganismide mürgistust. Üheks selliseks kemikaaliks on metüüelavhõbe, mida eelmisel sajandil tööstuste reoveega hulgaliselt merre juhiti. Praegu jõuab see erinevate meresaaduste kaudu inimeste toidulauale (Garnaga, 2012; Rheinheimer, 1998). Näiteks on täheldatud, et mõned Läänemerest püütavad kalaliigid on niivõrd saastunud, et ei sobi enam inimese toidulaua kasutamiseks, kuna mõjuvad kahjulikult inimorganismi hormoon- ja immuunsussüsteemile (Ruskule *et al.*, 2009).

### **1.2.2 Laevaliiklus Läänemerel**

Läänemeri kuulub ka kõige tihedama laevaliiklusega piirkondade hulka maailmas. Igapäevaselt viibib merel umbes 2000 registreeritud laeva ning igas kuus läbib Läänemerd kuni 5000 erinevat alust (Suzdalev *et al.*, 2014). Tähtsamad laevateed kulgevad läbi Taani väinade, ületades Ava-Läänemere, et jõuda Soome lahe sadamatesse. Umbes pooled Läänemerel liikuvatest kaubalaevadest veavad kaubana konteinereid, ro-ro veoseid, väetist,



teravilja, puitu, metalli ja sütt. Teise poole moodustavad naftatankerid ja reisilaevad (Ruskule *et al.*, 2009).

Soome lahe ääres asub kokku 17 naftasadamat, mis käitlevad naftat ja erinevaid naftasaadusi. Nendest kuus asub Soomes, kuus Eestis ja viis Venemaal. Suurimad neist on Sköldvik, Muuga, Primorsk, Vysotsk, St. Petersburg ja Ust-Luga. 2020. aastaks hinnatakse Läänemere kaudu veetava nafta ja naftasaaduste koguseks kuni 200 miljonit tonni aastas. Säärane suur liiklustihedus Läänemerel tõstab naftalekete toimumise tõenäosust mitmekordselt. (Brunila ja StorgArd, 2014).

### **1.2.3 HELCOM**

Mõistes Läänemere majanduslikku, kultuurilist ja ühiskondlikku väärtust ja vajadust kõigile Läänemere-äärsetele riikidele, sõlmiti 1974. aastal riikidevaheline Läänemere kaitse konventsioon. Seda seati juhtima alaline rahvusvaheline komisjon peakorteriga Helsingis, rohkem tuntud Helsingi komisjoni ehk HELCOM (Läänemere merekeskkonna kaitse komisjon) leppena. Leppe eesmärgiks on ennetada erinevate reostusallikate sattumist merre, tehes koostööd Taani, Rootsi, Soome, Saksamaa, Eesti, Läti, Leedu, Poola, Venemaa ja Euroopa Liiduga, koordineerides rahvusvahelist koostööd merekeskkonna kaitseks vastavalt kaitsekonventsioonis ettenähtud punktidele. HELCOM-i töö jaguneb viide valdkonda: laevandus, mereohutus, maismaalt pärinev reostus, eluslooduse kaitse ja keskkonnaseire. HELCOM-i tulevikunägemuseks on tasakaalus töötav Läänemere keskkond mitmekülgsete bioloogiliste komponentidega, mille tulemuseks on hea ökoloogiline keskkond ning jätkusuutlik majanduslik ja sotsiaalne tegevus. Selle ühise eesmärgi ja visiooni nimel töötavad Läänemere-äärsed riigid, koondades oma jõud HELCOM-i (<http://www.helcom.fi/about-us>).

### **1.3 Toornafta**

Toornafta on kompleksne segu, koosnedes tuhandetest orgaanilistest ühenditest. Toornafta koostis sõltub leiukohast, kuid kirjanduse andmeil moodustavad alkaanid keskmiselt 30%, tsükloalkaanid 49%, aromaatsed ühendid 15% ja asfalteenid 6% kogumahust. Põhiliselt koosneb nafta süsinikust ja vesinikust, kuid väiksemates kogustes sisaldab ka hapnikku, väävlit, lämmastikku ja eriti väikestes kogustes teisi metallorgaanilisi ühendeid (Viggor *et al.*, 2013). Polütsükliilised aromaatsed süsivesinikud (PAH) on kõige levinum orgaaniliste ühendite rühm ning on kõige toksilisem osa toornaftast (Adbel-Shafy ja Mansour, 2016).

Erinevad naftasaadused satuvad merre juhuslikest naftaleketest, naftatankerite õnnetustest,

nafta puurimisel leiukohtadest ning terminalidest. Lisaks on maismaalt pärinev olme- ja reovesi märkimisväärselt reostusallikaks (Kostianoy *et al.*, 2005). 2017. aasta HELCOM-i aruande kohaselt on avastatud õlireostuste arv ja kogumaht aasta aastalt vähenenud, kuid probleem on siiski aktuaalne. Kokku avastati 2017. aastal 154 erinevat leket, millest 52 leidis kinnitust, et tegemist oli õlilekkega. Ülejäänud lekete puhul oli tegemist kas kalaõli, taimeõli või reoveega (Lisa 1). Tegemist on läbi aastate kõige madalama avastatud õlilekete arvuga. Kõigist avastatud 52 naftalekkest 43 olid väiksemad kui 1 m<sup>3</sup>. Suuremaid leide oli kolm, mis olid vastavalt 6 m<sup>3</sup>, 1,8 m<sup>3</sup> ja 1,4 m<sup>3</sup> (Lisa 2). Veel kümme aastat tagasi oli avastatud õlilekkeid üle kaheksaja ning viis aastat tagasi üle saja (Lisa 3) (HELCOM, 2018).

## **1.4 Bakterite roll naftasaaduste lagundamisel**

Võrreldes Läänemerd teiste meredega, on naftakatastroofi tagajärjed sellel looduse seisukohalt palju raskemad. Seda põhjustab Läänemere madal soolsus, akvatooriumi väike mahutavus, põhjapoolne asend ning vähene veevahetus. Kuna tegemist on väikese suletud merega, kiirendab see merre sattunud nafta kandumist rannikualadele. Põhjapoolne külmem kliima ning hapnikuvaene keskkond aeglustavad omakorda nafta bioloogilist lagunemist. Samuti raskendab naftakatastroofi likvideerimist talvine jääkate (Kaldma, 2007).

Bakteritel on oluline roll naftasaaduste ja teiste ohtlike kemikaalide lagundamisel mere ökosüsteemis. Kuna tegemist on madala soolsusega veekoguga, erinevad siinsed bakterikooslused tunduvalt mujal maailmameres olevatest kooslustest. Tundes nende koosluste struktuuri ja seda, kuidas nad reageerivad erinevatele tingimustele, aitab meil paremini mõista ja hinnata, kuidas erinevad faktorid mõjutavad Läänemere ökosüsteemi funktsiooni ja tasakaalu (Reunamo, 2015)

### **1.4.1 Alkaanide lagundamine**

Alkaanid on küllastunud süsivesinikud, mis koosnevad süsiniku ja vesiniku aatomitest. Nad võivad olla lineaarsed (n-alkaanid), tsüklilised (tsüklo-alkaanid) või hargnenud (iso-alkaanid). Alkaanid, mis sisaldavad ühte kuni nelja süsiniku aatomit (nt propaan ja metaan) on toatemperatuuril gaasilised. Molekulid viie kuni viieteistkümne süsiniku aatomiga (nt heksaan ja heptaan) on toatemperatuuril vedelad ning üle 15 süsiniku aatomit sisaldavad alkaanid on juba tahkes olekus. Alkaanid moodustavad kuni 50% toornafta koostisest sõltuvalt leiukohast. Samuti toodavad alkaane paljud elusorganismid nagu taimed, rohevetikad, bakterid või loomad. See selgitab, miks alkaane leidub väikestes kontsentratsioonides enamikes pinnase ja

veekeskkondades (Labinger ja Bercaw, 2002).

Alkaanid on mittepolaarsed hüdrofoobsed molekulid, kus süsinike vahel asuvad väga püsivad ühekordsed sidemed. Nende lõhkumiseks kulub väga palju energiat, mis muudab alkaanide lagundamise mikroorganismidele keeruliseks (Stauffer *et al.*, 2008). Sellest hoolimata kasutavad paljud mikroorganismid, näiteks hõimkonnad *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* ja *Proteobacteria* ning seened, erinevaid alkaane süsiniku- ja energiaallikana (van Beilen *et al.*, 2003; Harayama *et al.*, 1999; Hamamura *et al.*, 2008; Margesin *et al.*, 2003; Viggor *et al.*, 2013; Binadzadeh *et al.*, 2009). Paljud bakterid kasutavad siiski eelistatud süsinikuallikana alkaanide asemel pigem teisi substraate (Margesin *et al.*, 2003). Samas eksisteerib ka baktereid, mis kasvavad ainult alkaanidel, neid nimetatakse süsivesinikklastilisteks bakteriteks (Yakimov *et al.*, 2003). Näiteks perekonda *Alcanivorax* kuuluvad tüved suudavad lagundada nii lineaarseid kui hargnenud ahelaga alkaane, kuid ei suuda kasutada teisi energiaallikaid nagu aromaatsed ühendid ja suhkrud. Puhtas merevees leidub *Alcanivorax* sp. vähe ja ilmselt kasutab ta substraadina vetikate ja muude mereorganismide poolt toodetud alkaane. Samas on täheldatud, et naftareostuse järel tõuseb perekond *Alcanivorax* sp. arvukus hüppeliselt, mistõttu võib arvata, et need tüved mängivad olulist rolli bioremediatsioonis (Brooijmans *et al.*, 2009).

Alkaanide biodegradatsioon võib toimuda nii aeroobsetes kui ka anaeroobsetes tingimustes. Esimesel juhul kasutatakse elektronide aktseptorina hapnikku, teisel juhul nitraati, sulfaati, rauaiooni või süsihappegaasi. Juhul kui n-alkaanid sisaldavad kahte või enam süsiniku aatomit, kulgeb aeroobne lagundamine terminaalset rada mööda, läbi terminaalise metüülrühma oksüdeerimise ning tekib primaarne alkohol. Edasise oksüdeerimise tulemusena saab sellest aldehüüd, mis konverteeritakse rasvhappeks, millest  $\beta$ -oksüdatsiooni rajas tekib rasvhappe atsetüül-CoA (van Beilen *et al.*, 2003). Samuti on tuntud ka n-alkaanide subterminaalne lagundamine. Esmalt tekib alkaanist sekundaarne alkohol, mis konverteeritakse temale vastavaks ketooniks ja seejärel oksüdeeritakse estriks. Ester hüdrolyüsitakse esteraasi poolt alkoholiks ja rasvhappeks. Mõlemad rajad, nii terminaalne kui ka subterminaalne, võivad eksisteerida korraga samas mikroorganismis (Whyte *et al.*, 1998). Kuigi rasvalkoholide ja rasvhapete oksüdeerimine on mikroorganismide seas väga levinud, nõuab alkaani molekulide aktiveerimine ensüüme, mis on vähem levinud, kuid samas kuuluvad nad erinevatesse ensüümide klassidesse (Yakimov *et al.*, 1998). Mikroorganismid, kes kasutavad energia allikana lühikese ahelaga gaasilisi alkaane (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>), omavad enamasti ensüümi metaani monooksügenaasi. Keskmise ahela pikkusega vedelaid (C<sub>5</sub>-C<sub>16</sub>) või pikema

ahelaga tahkeid alkaane (>C16), lagundatakse sageli membraanseoseliste alkaani hüdroksülaasidega (AlkB). Pikkade alkaanide (>C16) lagundamiseks kasutatakse peamiselt kahte tüüpi alkaani hüdroksülaase - AlmA ja LadA (Ayala ja Torres, 2004). LadA on kahest komponendist koosnev ekstratsellulaarne termofiilne flaviinisõltuv oksügenaas, mis kuulub bakteriaalsete lutsiferaasi valkude perekonda ning oksüdeerib C10-C30 alkaane. AlmA on flaviinseoseline Baeyer-Villiger tüüpi tsütoplasmaatiline monooksügenaas, mis oksüdeerib C20-C36 alkaane (Throne-Holst *et al.*, 2006).

#### 1.4.2 Aromaatsete ühendite lagundamine

Tööstusliku tegevuse tagajärjel satub keskkonda suurel hulgal aromaateid ja polütsüklilisi aromaateid süsivesinikke, mis moodustavad olulise osa looduskeskkonnas leiduvatest inimtekkelistest saasteainetest nagu näiteks: benseen, toluen, fenool, kresoolid, salitsülaad, naftaleen jne. Suur enamus nimetatud ühenditest mõjuvad elusorganismidele kantserogeenselt, toksiliselt või on muul viisil mutageensed (Mishra *et al.* 2001). Aromaatsete ühendite hulk toornaftas varieerub 5% kuni 30% sõltuvalt leiukohast (Vanhoenacker *et al.*, 2015).

Aja jooksul on mitmed mikroorganismid, põhiliselt bakterid ja seened, õppinud aromaateid ühendeid lagundama (Mishra *et al.*, 2001). Selleks kasutatakse erinevaid kataboolseid radasid (Joonis 1), mis paiknevad kas plasmiidis või kromosoomis. Juba 1994.a kirjeldati perekonda *Pseudomonas* kuuluvate bakterite väga head benseeni, tolueni, ksüleeni ja naftaleeni lagundamise võimet (Williams ja Sayers, 1994).

Benseen ja toluen esinevad looduslikult naftas ja kiviões ning on peamised bensiini komponendid. Tööstuslikult toodetakse tolueni lahustite ja teiste kemikaalide lähteainena. Tolueni ja teiste aromaatsete ühendite esmane lagundamine on mikroorganismidele kõige keerulisem, mis tuleneb benseenituumade keemilisest stabiilsusest. Tuuma destabiliseerimiseks ja edasiseks degradeerimiseks aeroobsetes tingimustes kasutatakse hapnikku. Selleks on bakteritel kahte tüüpi ensüüme – dioksügenaasid ja monooksügenaasid. Dioksügenaasid katalüüsivad cis-dihüdrodioolprodukti moodustumise ning see töödeldakse dehüdrogeenimisega 3-metüülkatehooliks. Monooksügenaasid hüdroksüleerivad tolueni *ortho*-, *meta*- või *para*-asendis, millele järgneb teine hüdroksüülimine sama või erineva hüdroksülaasiga katehooli moodustumiseks (Parales *et al.*, 2008). de Lima-Morales *et al.*, 2016 näitas oma artiklis kahe *Pseudomonas veronii* tüve esinemist benseeniga saastunud aladel, kellel olid unikaalsed kataboolsed rajad benseeni degradeerimiseks, sisaldades geeniklastrit, mis kodeerib isopropüülbenseeni dioksügenaasi (de Lima-Morales *et al.*, 2016).

Fenooli lagundamiseks kasutavad mikroorganismid fenooli hüdroksülaase, mis hapnikuaatomi lisamisega aromaatsel tuumale konverteerivad fenooli katehhooliks (Dagley ja Gibson, 1965). Fenooli hüdroksülaasid jagunevad kahte gruppi - ühekomponentsed ja multikomponentsed, mikroorganismide seas esineb rohkem viimati nimetatud hüdroksülaase (Futamata *et al.*, 2001). Fenooli lagundamise võimet on kirjeldatud paljudel erinevatel bakteri perekondadel nagu näiteks: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Thauera*, *Azoarcus*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus* (Cordova-Rosa *et al.*, 2009; Valle *et al.*, 2004; Sueoka *et al.*, 2009).

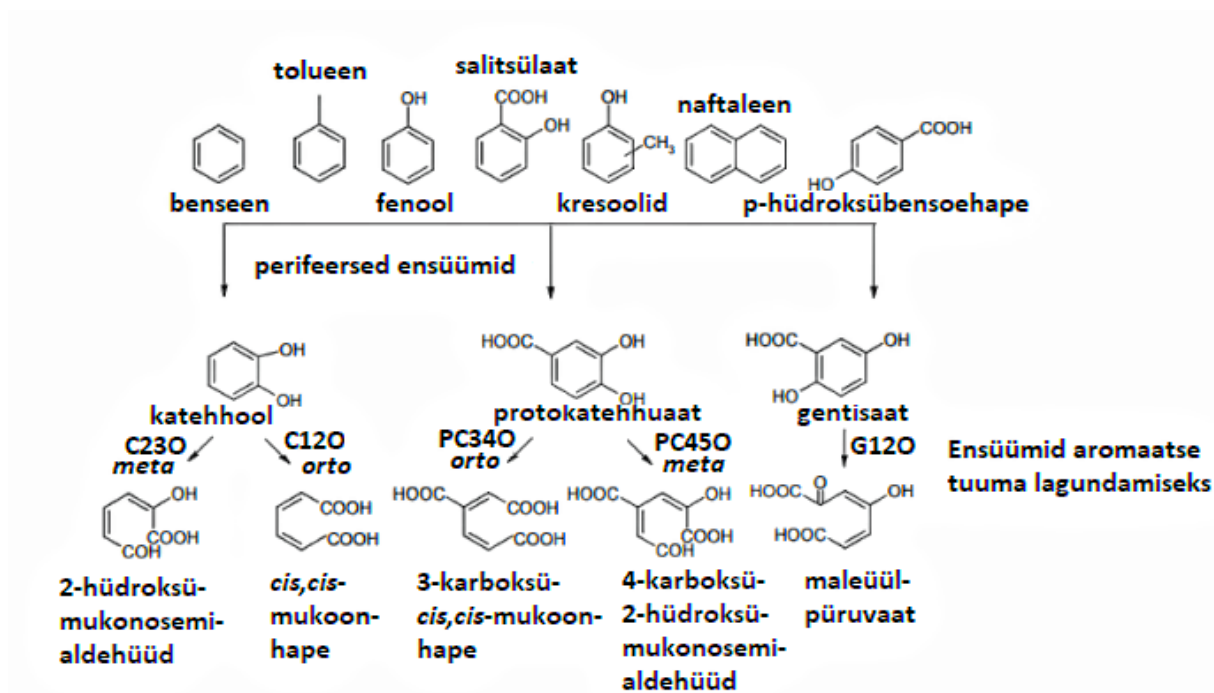
Naftaleen on aromaadne bitsükliline süsivesinik, mida leidub erinevates naftasaadustes. Tegemist on kõige lihtsama ja polütsüklilistest aromaatsetest ühenditest (PAH) kõige paremini vees lahustuva ühendiga, mistõttu kasutatakse seda uurimaks bakterite võimet lagundada PAH-e. Baktereid, kes suudavad naftaleeni kasutada energia allikana on näiteks perekonnad: *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Polaromonas*, *Ralstonia* ja *Mycobacterium* (Seo *et al.*, 2009; Nair *et al.*, 2008; Pawar *et al.*, 2013). Tavaliselt toimub naftaleeni lagundamine üle salitsülaadi. Tuntuim naftaleeni lagundamise rada paikneb *Pseudomonas putida* tüve G7 plasmiidil pNAH7. Naftaleeni degradeerivaid ensüüme kodeerivad geenid paiknevad kahes operonis: ülemises operonis paiknevad naftaleeni salitsülaadiks konverteerivate ensüümide geenid ja alumises operonis asuvad geenid, mis kodeerivad salitsülaadi edasist lagundamist katehhooliks ning järgnevateks põhiainevahetuse vaheühenditeks vajaminevaid ensüüme (Yen ja Gunsalus, 1985).

Salitsülaadi lagundamist on samuti palju uuritud just perekonna *Pseudomonas* tüvedel (Sazonova *et al.*, 2008; Chakrabarty, 1972; Jõesaar *et al.*, 2017; Ahn *et al.*, 2017). Salitsülaadi lagundamiseks on kaks rada, ühe raja vaheühendiks on katehhool ja teisel gentisaat (Civilini *et al.*, 1999). Salitsülaad muudetakse kas salitsülaadi 1-hüdroksülaasi abil katehhooliks (Bosch *et al.* 1999) või salitsülaadi 5-hüdroksülaasi (Fuenmayor *et al.*, 1998) abil gentisaadiks. Gentisaadi rada on vähem levinud kui katehhooli rada. Katehhooli aromaadne tuum lõhustatakse kas katehhooli 1,2-dioksügenaasi või 2,3-dioksügenaasiga (An *et al.*, 2001), samas kui gentisaat degradeeritakse gentisaadi 1,2-dioksügenaasiga (Chua *et al.*, 2001). Gram-positiivsetes bakterites, sealhulgas *Streptomyces* spp. on leitud, et salitsülaadi lagundamiseks võib ühel bakteril olla olemas nii katehhooli kui ka gentisaadi rada (Grund *et al.*, 1990).

Katehhooli dioksügenaasid on looduses laialt levinud metalli sisaldavate bakteriaalsete ensüümide klass, mis mängivad olulist rolli aromaatsete ühendite lagundamises läbi

aromaatse tuuma avamise. Katehhooli dioksügenaasid jagunevad kaheks grupiks: intradioolsed (*ortho* rada, nt katehhooli 1,2-dioksügenaas) ja ekstradioolsed (*meta* rada, nt katehhooli 2,3-dioksügenaas) dioksügenaasid. See sõltub sellest, millises orientatsioonis toimub aromaatse tuuma avamine (Broderick, 1999). Ekstradioolsed ensüümid lõhuvad aromaatse tuuma hüdroksüleeritud süsiniku aatomi ja kõrvaloleva mittehüdroksüleeritud süsiniku vahelt ning intradioolsed dioksügenaasid lõhuvad tuuma kahe hüdroksüülrühma vahelt (Harayama ja Rekik *et al.*, 1989).

Bakteriaalne aeroobne aromaatsete ühendite lagundamine toimub mitmeetapiliselt. Esmalt muudetakse substraat dihüdroksüaromaatseks vaheühendiks, milleks on kas katehhool, gentisaat, protokatehhuaat või nende derivaadid (Joonis 1). Selles etapis osalevad ensüümid nagu mono- ja dioksügenaasid katalüüsivad ühe või kahe hapniku aatomi sisestamist aromaatsela ühendile hüdroksüülrühmana (van der Meer *et al.*, 2002). Katehhool ja protokatehhuaat suunatakse edasi kas *ortho*- või *meta* katabolismiratta. *Ortho*-lagundamisrajas katalüüsib benseenituuma avamist katehhooli puhul katehhooli 1,2-dioksügenaas (C12O) ja protokatehhuaadil protokatehhuaadi 3,4-dioksügenaas (P34O). Ornston ja Stainer näitasid *Pseudomonas putida* rakkudes protokatehhuaadi ja katehhooli kataboliseerimisel kahe paralleelse *ortho*-lagundamisraja olemasolu (Ornston ja Stanier, 1966). C12O ensüümi aktiivsaias asub Fe(III), kuhu reaktsiooni käigus seondub esmalt substraat, tekitades Fe<sup>3+</sup> ja katehholaadi kompleksi ning seejärel hapnik. Edasiste reaktsioonide käigus lagundatakse aromaadne tuum *cis,cis*-mukonaadiks, mis lõpuks konverteeritakse suksinaadiks ja see omakorda siseneb põhiainevahetusradadesse (van der Meer, 1997). P34O lagundab aromaatse tuuma 3-karboksü-*cis,cis*-mukonaadiks, mis edasi siseneb põhiainevahetusse atsetüül-CoA-na. Katehhooli ja protokatehhuaadi *meta* rajas lagundamist viivad läbi vastavalt katehhooli 2,3-dioksügenaas (C23O) ja protokatehhuaadi 4,5-dioksügenaas (P45O). C23O aktiivtsentris asub Fe<sup>2+</sup>. Reaktsiooni käigus avatakse aromaadne tuum hüdroksüülrühmade kõrvalt, mille tulemusena tekib 2-hüdroksümukonaat-6-semialdehüüd ning järgnevate reaktsioonide käigus konverteeritakse tekkinud substraat püruvaadiks ja atseetaldehüüdiks (Joonis 1) (Harwood ja Parales, 1996). Gentisaadi lagundamist katalüüsib gentisaadi 1,2-dioksügenaas (G12O) ning moodustub maleüülpüruvaat (Harpel ja Lipscomb, 1990).



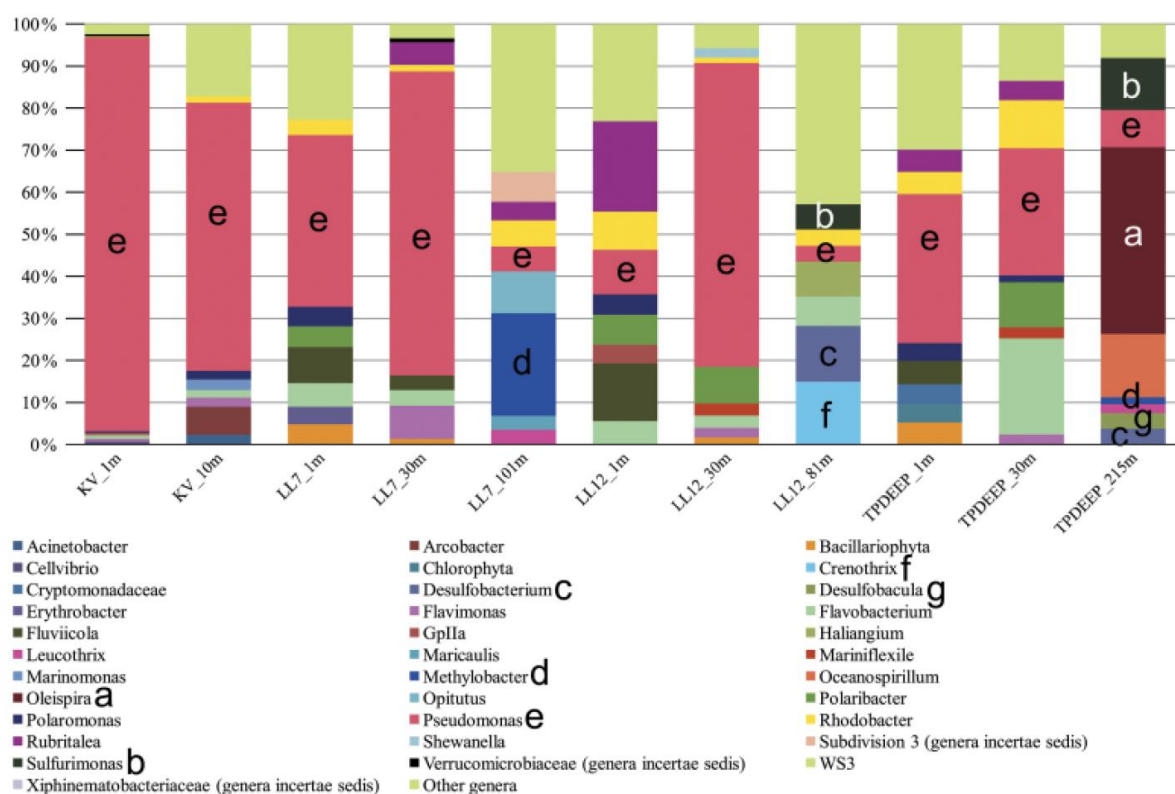
Joonis 1. Aromaatse tuumaga ühendite lagundamine aeroobsetes tingimustes (C12O katehhooli 1,2-dioksügenaas, P34O protokatehhuaadi 3,4-dioksügenaas, C23O katehhooli 2,3-dioksügenaas, P45O protokatehhuaadi 4,5-dioksügenaas, G12O gentisaadi 1,2-dioksügenaas), modifitseeritud joonis (Harwood ja Parales, 1996).

## 1.5. Läänemere mikroobikooslused

Läänemere mikroobikooslusi on siiani uuritud väga palju 16S rRNA geeni põhiste analüüsidega (Edlund *et al.*, 2008; Koskinen *et al.*, 2011). Madala soolsuse tõttu erinevad siinsed bakterikooslused tunduvalt mujal maailmameres olevatest kooslustest (Reunamo, 2015). Tänu unikaalsele keskkonnale võib Läänemerest leida koos nii mere-, riim-, kui ka magevee bakteri liike (Koskinen *et al.*, 2011).

Koskinen koos töökaaslastega kogus 2008.a veeproove kahest erinevast Läänemere piirkonnast. Proovid võeti Soome lahe avamere osast kolmest erinevast proovipunktist 1 m ja 30 m sügavuselt veepinnast ning 1 m kauguselt merepõhjast. Samuti koguti veeproovid ranniku lähedalt 1 m ja 10 m sügavuselt (Joonis 2). Bakterite mitmekesisuse ja struktuuri uurimiseks kasutati 16S rRNA geeni V3 segmendi 454 pürosekveneerimist. Saadud uurimustulemused näitasid, et erinevatelt sügavustelt võetud proovide bakterikooslused on erinevad, kuid omavahel olid sarnasemad samalt sügavuselt võetud veeproovide kooslused. Koosluste 16S rRNA geeni järjestuste analüüs näitas, et 53% kõikidest järjestustest sarnanesid *Gammaproteobacteria* klassi kuuluvate bakterite järjestustega, millest kõige arvukamalt oli esindatud kõikides proovipunktides perekond *Pseudomonas* (45% järjestustest). Teine kõige

enam esindatud perekond oli *Oleispira* (9%), kelle järjestused proovipunktide lõikes olid väga ebaühtlaselt jaotunud (99% järjestustest leiti ühest proovipunkti kooslusest). Teised kooslustes esindatud suurema osakaaluga klassid olid *Flavobacteria* (13%), *Betaproteobacteria* (7%), *Alphaproteobacteria* (6%) ja *Actinobacteria* (4%) (Koskinen *et al.*, 2011).

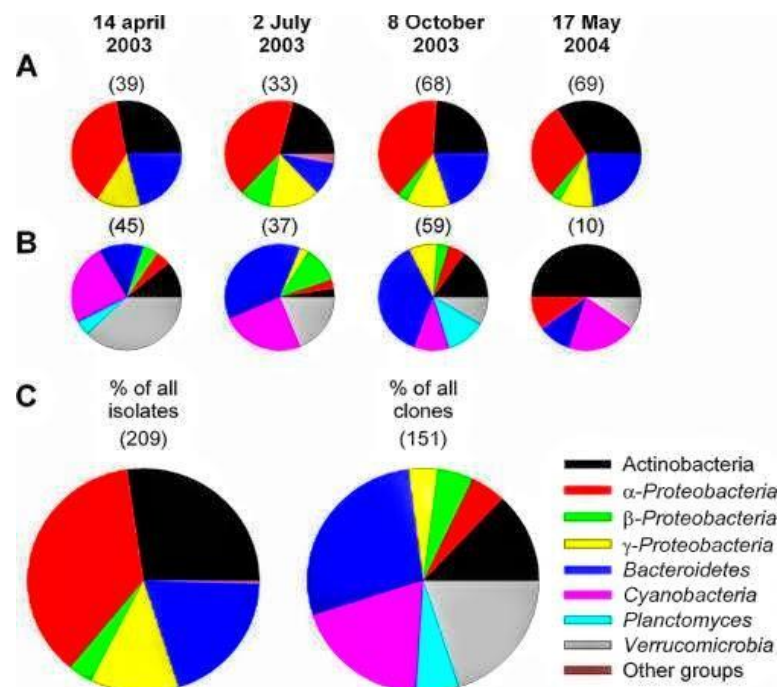


Joonis 2. 2008. aastal võetud Läänemere rannikulähedase (KV) ja kolme erineva avamere proovipunkti (LL7, LL12, ja TPDEEP) koosluste seitsme kõige suurema osakaaluga bakteriperekonna suhtelised arvukused. Proovipunktide järel olevad numbrid (1m, 10m, 30m jne.) näitavad, kui sügavalt veeproov võeti. a - *Oleispira*; b - *Sulfurimonas*; c - *Desulfobacterium*; d - *Methylobacter*; e - *Pseudomonas*; f - *Crenothrix*; g - *Desulfobacula*. (Koskinen *et al.*, 2011).

Riemann jt. (2008) kogusid oma uurimistöös 2003. aastal märtsist kuni oktoobrini ja 2004. aasta mais pinnaveeproove ühest Läänemere keskosas paiknevast uurimisjaamast umbes 3 meetri sügavuselt iga ühe kuni kolme nädala tagant, et uurida bakterikoosluste hooajalist muutumist varieeruvates keskkonnatingimustes. Täielikuma ülevaate saavutamiseks kasutati koosluste uurimiseks DNA-põhiseid (16S rRNA geenifragmendi klooniraamatukogude koostamine, 16S rRNA geenifragmendi DGGE profiilide analüüs) ja kultiveerimis-põhiseid



(tüvede isoleerimine mikrokosmidest ja erineva koostisega agarplaatidelt) meetodeid. Nende uuring näitas, et Läänemere pinnavee mikroobikooslused on pigem tüüpilised magevee bakterikooslused ning puuduvad mitmed merekeskkonnale tüüpilised taksonid. Agarplaatidelt isoleeriti kokku 209 bakteritüve, mis jagunesid hõimkondadesse *Alphaproteobacteria* (37%), *Actinobacteria* (27%) ja *Bacteroidetes* (20%), *Gammaproteobacteria* (12%), *Betaproteobacteria* (3%) ja *Firmicutes* (üks isolaat). 16S rRNA geenifragmendi klooniraamatukogudest saadud 151 kloni järjestuste analüüsi tulemusel olid kooslustes esindatud hõimkonnad *Bacteroidetes* (28%), *Verrucomicrobia* (20%), *Cyanobacteria* (19%), *Actinobacteria* (13%), *Planctomyces* (6%), *Alphaproteobacteria* (5%), *Gammaproteobacteria* (5%) ja *Betaproteobacteria* (4%) (Joonis 3).

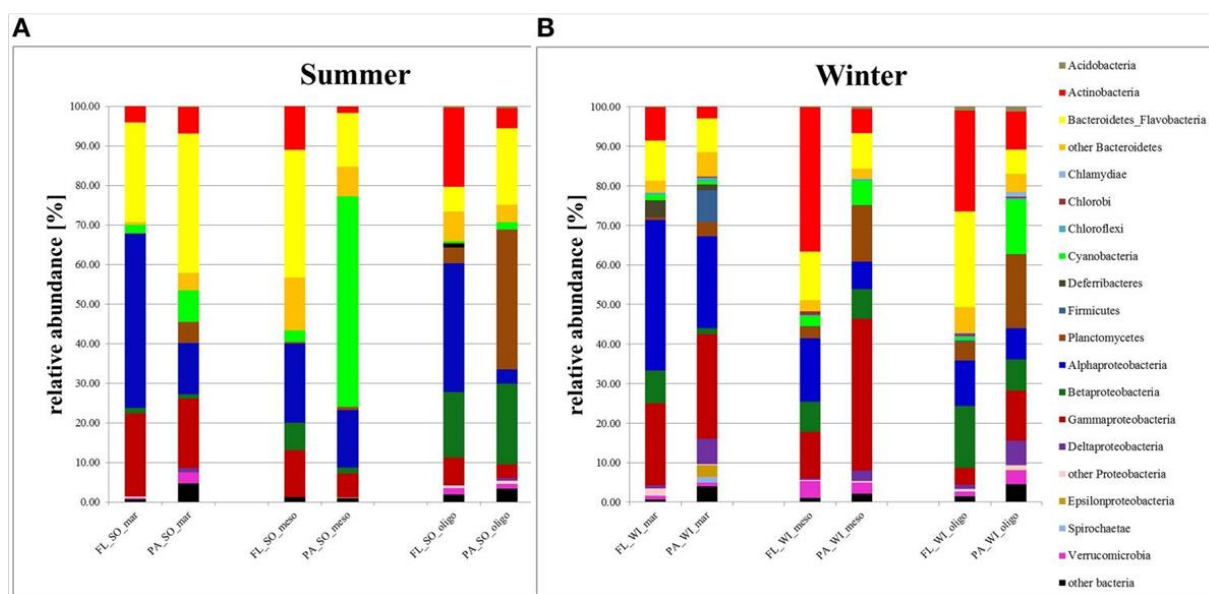


Joonis 3. Läänemere keskosast erinevatel ajahetkedel võetud proovidest isoleeritud tüvede (A) ja koosluste 16S rRNA geenifragmendi klooniraamatukogude kloonide (B) järjestuste mitmekesisus klassi tasemel. Proovide summeeritud isolaatide ja kloonide fülogeneetiline kuuluvus (C), koguarv on märgitud diagrammi kohale. (Riemann *et al.*, 2008).

Võrreldes agarplaadilt isoleeritud ja klooniraamatukogude järjestuste põhjal saadud tulemusi, ei esinenud plaadilt isoleeritud tüvede seas suuri hooajalisi erisusi, kuid märgati olulisi muutusi koosluste klooniraamatukogudes aastaegade vahetumisel. Näiteks vähenes *Verrucomicrobia* osakaal 38%-lt kevadel 9-19%-ni suvel, samas tõusis *Bacteroidetes* osakaal 13%-lt 38%-ni sügisel. Samuti tõusid *Gammaproteobacteria* ja *Planctomyces* esindajate

osakaal sügisel. Koosluste muutumise olulisteks teguriteks peeti toitainete kättesaadavust, fütoplanktoni biomassi kontsentratsiooni ja vee temperatuuri (Riemann *et al.*, 2008).

2011. aasta talvel ja 2012. aasta suvel kogus Rieck (2015) oma uurimisrühmaga kolmest erineva soolsusega Läänemere piirkonnast pinnaveeproove, et võrrelda sealseid mikroobikooslusi suve- ja talveperioodil, kasutades proovide 16S rRNA geeni V3 ja V4 segmendi järjestuste sekveneerimiseks 454 pürosekveneerimist. Saadud tulemused näitasid, et talveperioodil võetud proovide mikroobikooslused olid mitmekesisemad kui suvel kogutud proovide omad. Kõikides proovipunktides olid domineerivateks klassideks *Alfa*-, *Beta*-, *Gamma*- ja *Deltaproteobacteria* ning *Bacteroidetes* (Joonis 4).



Joonis 4. Läänemere pinnaveeproovidest (A - suvi, B - talv) eraldatud osakestele kinnitunud (PA) ja vabalt elavate (FL) bakterikoosluste suhtelised arvukused klasside tasemel, modifitseeritud joonis (Rieck *et al.*, 2015).

Väiksem osakaal koosluses oli *Flavobacteria*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Cyanobacteria* ja *Verrucomicrobia* esindajatel. Talveperioodil domineerisid peamiselt *Alpha*-, *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* ja *Actinobacteria* esindajad ning suveperioodil *Planctomycetes*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Alpha*-, *Beta*- ja *Gammaproteobacteria*. Lisaks märgati, et *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* ja *Planctomycetes* suhteline arvukus suurenes merevee soolsuse tõustes, samas kui *Actinobacteria*, *Betaproteobacteria* ja *Bacteroidetes* suhteline arvukus soolsuse tõustes vähenes oluliselt (Rieck *et al.*, 2015).

Bakteritel on tähtis roll erinevate kemikaalide lagundamisel mere keskkonnas. Praeguseks on teada, millised on peamised hõimkonnad Läänemere mikroobikoosluses ning kuidas nende osakaalud muutuvad erinevate keskkonna tegurite mõjul. Enamus töid on keskendunud soojal perioodil kogutud proovidest koosluste iseloomustamisele, kuid vähem on uuritud talviseid kooslusi. Erilist huvi pakuvad kooslused/mikroobid, kes vastutavad naftasaaduste (suurima tõenäosusega toimuda võiv reostus) lagundamise eest talvisel ajal kui välistemperatuur on madal ja meri kaetud jääga. Uute tüvede isoleerimine ja iseloomustamine aitab meil paremini mõista mikroobikooslustes toimuvaid muutusi ning nende reageerimist reostusele. Kataboolsete ensüümide uurimine, aitab leida uusi potentsiaalseid tüvesid, keda kasutada bioremediatsiooni strateegiate väljatöötamisel ja parandamisel, et saavutada erinevate toksiliste ühendite efektiivne lagundamine aastaringselt.

## **2. EKSPERIMENTAALNE OSA**

### **2.1 Töö eesmärgid**

Käesoleva uurimistöö eesmärkideks on:

- a) hinnata külmal perioodil Läänemere pinnavee ja setete mikroobikoosluste kataboolset potentsiaali erinevate naftast pärinevate süsivesinike lagundamisel;
- b) isoleerida ja iseloomustada mikroobitüvesid, keda oleks võimalik kasutada bioaugmentatsioonil õlireostuse likvideerimiseks;
- c) tuua välja geneetilised tegurid, mis vastutavad aromaatsete ja alifaatsete ühendite katabolismi eest.

### **2.2 Materjal ja meetodika**

#### **2.2.1 Veeproovide võtmine, filtreerimine ja DNA eraldamine**

Veeproovid võeti 2016. aasta jaanuaris kolmest Läänemere piirkonnast umbes 0,5 m sügavusest veekihi (TÜ Mereinstituut, Arno Põllumäe) ning viiest proovipunktist rannikul. Lisaks veeproovidele võeti rannikult ka sedimendiproovid. Täpsed asukohad on märgitud Joonisel 5. Veeproovid toodi laborisse 10-liitrites steriilsetes kanistrites.

Koosluste DNA eraldamiseks filtreeriti veeproovid ühe liitri kaupa läbi 0,22 µm poori suuruse ja 47 mm diameetriga steriilsete filtrite (Sartorius AG, Saksamaa). Filtrid paigutati -80 °C juurde steriilsetes koekultuuritopsides kuni DNA eraldamiseni. Filtritelt koosluse DNA eraldamiseks kasutati MO BIO PowerSoil™ DNA Kit'i (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad), järgides tootjapoolset protokollit.

#### **2.2.2 Mikrokosmid ja bakteritüvede isoleerimine**

Mikrokosme kasvatati 250 ml Erlenmeyer'i kolbides, millesse lisati 50 ml merevett või 5 g sedimenti ning 45 ml sama proovipunkti filtersteriilitud merevett ja toornaftat lõppkontsentratsiooniga 1%. Kolbe inkubeeriti ringloksutil 100 rpm/min kolm nädalat temperatuuridel 4 °C, 10 °C, 15 °C ja 20 °C. Kolme nädala möödudes võeti kolbidest

koosluse DNA eraldamiseks 40 ml proovi ning eraldati sellest bakterirakud tsentrifuugimisega 5000p/min 25 minutit. Saadud bakterimassist eraldati koosluste DNA vastavalt punktis 2.2.1 kirjeldatule.

Mikroobid isoleeriti vee- ja sedimendiproovide otsekülvidest kui ka mikrokosmidest. Väljakülvid tehti proovide erinevatest lahjendustest minimaalsöötme plaatidele, mis sisaldasid 1x mineraalainete segu M9 (Adams, 1959), 1x mikroelementide segu (Bauchop ja Elsdén, 1960) ja 1,5% agarit. Tassi kaanele asetati filterpaber, millele lisati 200 µl substraati (heksadekaani, heptaani, diiselkütust, toornaftat). Naftaleeni lisati tassi kaanele kristallidena. Lisaks tehti väljakülvid selektiivsöötmetele, kus substraadiks kasutati naatriumsalitsülaati (1,3 mM) või fenooli (2,5 mM).

Külve inkubeeriti 3 nädalat 20 °C juures. Puhaskultuuride isoleerimiseks tehti lahjenduskülv morfoloogiliselt erinevatest kolooniatest R2A tassidele. Õved kõrvaldati kasutades BOX-PCR metoodikat (Louws *et al.*, 1994), analüüsides puhaskultuuride genoomseid sõrmejälgi. Saadud puhaskultuure säilitati glütseroolis -80 °C juures.

### 2.2.3 Geenifragmentide amplifitseerimine

Geenide (16S rRNA, C23O, LmPH, *alkM*, *alkB*, *almA*) fragmendid amplifitseeriti PCR meetodil. PCR reaktsioonisegu lõppmaht oli 25 µl, mis sisaldas 1x lõppkontsentratsiooniga PCR puhvrit [75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% Tween 20], 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM igat nukleotiidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,8 µM praimereid (Tabel 1), 0,5 U Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific™, Leedu) ja 0,5-3 µl raku lüsaati. Lüüsimiseks kuumutati rakke 96 °C juures 15 minutit ning rakukestad eraldati tsentrifuugimisel 13000 x g, 1 min. Amplifikatsiooniprogramm algas initsiatsioonietapiga 95 °C 5 minutit. Järgnevad etapid kordusid 30 tsükli vältel: DNA ahelate denaturatsioon 95 °C 1 minut, praimerite seondumine vastava seondumistemperatuuri juures (Tabel 1) 1 minut, DNA süntees 72 °C juures vastavalt eeldatava produkti suurusele arvestusega, et 1000 ap sünteesiks kulub üks minut. Peale viimast tsükli toimus lõppekstensioon 72 °C 10 minutit.

**Tabel 1.** Töös kasutatud praimerid

Sihetmärg geen	Praimeri nimetus	5'→3' järjestus	Seondumis temperatuur (°C)	Sünteesiaeg (min)	Produkti pikkus (ap)	Viide
16S rRNA	PCR I	AGAGTTT GATCATGGCTC AG	55	2	~1500	Weisburg et al., (1991)
	PCR II	TACGGTTACCTTGTTACG ACTT				
	SEQ1	GTATTACCGCGGCTGCTG G	57	1	~480	Vedler <i>et al.</i> , (2000)
	PRBA338f*	ACTCCTACGGGAGGCAGC AG	53	1,5	~220	Lane (1991)
	PRUN518r	ATTACCGCGGCTGCTGG				Muyzer et al. (1993)
alkB	AlkBF <sup>1</sup>	TACGGNCACTTYTACVYC GA	50	1	~370	Viggor <i>et al.</i> , (2013)
	AlkBR <sup>1</sup>	CCRTARTGYTCGAGRTAG TT				
alkM	AlkMF	CGIGIIGCIACICCTGAAGAT CCAGC	50	1	~370	Margesin <i>et al.</i> , (2003)
	AlkMR	ITTATTITTCCAICTATGCTC TGG				
almA	AciAlmaF	TTCGTTCWGAYTCKGATA TGTC	50	1	~700	Käesolev töö
	AciAlmaR	CTTGCGWGTAAGTGTTTC ATATCC				
LmPH	pheUf	CCAGGSBGARAARGAGAR GAARCT	→56	1	~620	Futamata <i>et al.</i> , (2001)
	pheUr	CGGWARCCGCGCCAGAAC CA				
LmPH	Pheh-3F	CGKATGACSTACGGCTGG ATGGGCG	60,5	1	~870	Sandhu <i>et al.</i> , (2009)
	Pheh-3R	ACGTCTGTTCGATGATCT CCTTGATCCGC				
C120	RHO-f	GCCGCCACCGACAAGTT	57	1	~630	Tancsics <i>et al.</i> , (2008)
	RHO-r	CACCATGAGGTGCAGGTG				
C120	AciC12OF	CGTGCWGATGARGCHGAT GC	57	1	~512	Käesolev töö
	AciC12OR	ACGIGTYGCRAADGCAAA GTC				
C230	ORF-F	AGGTGWCGETSATGAAMA AAGG	60→55	1	~930	Junca <i>et al.</i> , (2004)
	ORF-R	TYAGGTS AKMACGTTCAK GAA				
Vektor pTZ57R/T	M13-F	CATTTTGCTTGCCGGTCA	50	Variee rub	Varieer ub	Thermo Scientific™, Leedu
	M13-R	AACAGCTATGACCATG				
Kordus- järjestus	BOXA1R	CTACGGCAAGGCGACGCT GACG	53→68	1→8	Varieer ub	Louws <i>et al.</i> , (1994)

\* GC-klmaber (CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGG, Muyzer *et al.*, (1993)) on lisatud praimeris 5' otsa.

## 2.2.4 Geelelektroforees

PCR edukust kontrolliti geelelektroforeesil 100 V juures 1x TAE puhvris. Geelina kasutati 0,8% agarosgeeli 1x TAE puhvris, millele lisati DNA visualiseerimiseks etiidiumbromiidi ( $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Geeli hambasse kanti 6  $\mu\text{l}$  proovi, mis segati eelnevalt 1  $\mu\text{l}$  laadimispuhvriga (6x MassRuler<sup>TM</sup> Loading Dye Solution; 10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,03% broomfenoolsinine; 60% glütserool; 60 mM EDTA; (Thermo Scientific<sup>TM</sup>, Leedu)). Produkti suuruse hindamiseks kasutati 1 kb suurust DNA suurusmarkerit (GeneRuler<sup>TM</sup>; Thermo Scientific<sup>TM</sup>, Leedu). Geeli pildistati UV transilluminaatoril.

## 2.2.5 Sekveneerimine

Amplifitseeritud geenifragmentide sekveneerimiseks töödeldi PCR segu praimerite lõhkumiseks ja nukleotiidide inaktiveerimiseks ensüümidega eksonukleas I (ExoI; Thermo Scientific<sup>TM</sup>, Leedu; lõppkontsentratsiooniga  $0,36 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$ ) ja kreveti aluselise fosfataasiga (SAP; Thermo Scientific<sup>TM</sup>, Leedu; lõppkontsentratsiooniga  $0,14 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$ ) 37 °C 15 minutit. Seejärel ensüümid inaktiveeriti 80 °C juures 15 minutit. Sekveneerimiseks kasutati BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-i (Applied Biosystems Inc., USA) vastavalt tootjapoolsele protokollile.

Sekveneerimisreaktsioon viidi läbi PCR programmiga, mis koosnes 30 tsüklist. Iga tsükkel sisaldas kolme etappi: DNA ahelate denaturatsioon 95 °C 15 sekundit, praimerite seondumine vastaval seondumistemperatuuril (Tabel 1) 10 sekundit ning DNA süntees 60 °C juures 45 sekundit. Geenifragmendid sekveneeriti Applied Biosystems täisautomaatse kapillaarsekvenaatoriga 3730xl DNA Analyzer.

## 2.2.6 Sekveneeritud järjestuste analüüs

Sekveneeritud järjestuste analüüsimiseks kasutati programmi BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999). Saadud geenijärjestusi võrreldi BLAST (The Basic Local Tool Alignment Search Tool) otsingumootori abil järjestustega GeneBank andmebaasis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Vastavate fülogeneetiliste puude tegemiseks kasutati Mega (versioon 7.0.21) programmi (<http://www.megasoftware.net/>).

### 2.2.7 Denatureeriva gradiendiga geelelektroforees (DGGE)

16S rRNA geenifragmentide DGGE analüüs (Muyzer *et al.*, 1993) viidi läbi INGENYphorU-2 x 2 elektroforeesisüsteemiga (Ingeny International, Holland) vastavalt tootjapoolsele protokollile, kasutades 40-60% denatureeriva gradiendiga (100% denatureeriv gradient sisaldab 7 M ureat ja 40% formamiidi) 10% polüakrüülamiidgeeli (akrüülamiid-bisakrüülamiid 37,5:1), mis oli valmistatud 1xTAE puhvril. Polümerisatsiooni katalüsaatoriteks olid ammooniumperoksüsulfaat (APS; 0,4 µl ml<sup>-1</sup>) ja tetrametüületüleendiamiin (TEMED; 0,53 µl ml<sup>-1</sup>). Geeli hambad valmistati denaturantideta akrüülamiidide lahusest. Ühte geelihambase kanti ~500 ng koosluse DNA-lt amplifitseeritud 16S rRNA geeni PCR produkti (eelnevalt PCR produkt sadestati 25 min - 20°C juures 1/10 mahu 5M NaCl ja 2 mahu 96% etanooliga; tsentrifuugiti 13000 x g, 15 min; sade pesti 200 µl 70% etanooliga; tsentrifuugiti 13000 x g, 4 min; sade lahustati 25 µl vees. DNA kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriga NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA)) ja 6 µl laadimispuhvri (6x MassRuler™ Loading Dye Solution; Fermentas, Leedu) segu. Elektroforees viidi läbi 1x TAE puhvril konstantsel temperatuuril 60 °C, 13 tundi, 100 V pinge juures. Geeli värviti 15 minutit MilliQ vees, kuhu lisati etiidiumbromiidi (EtBr; 0,5 µg l<sup>-1</sup>) ning pärast pesti geeli 15 minutit MilliQ vees. Geeli pildistamiseks kasutati Molecular Imager® Gel Doc™ XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) UV transilluminaatorit ja arvutiprogrammi Quantity One® (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). DGGE geelipildi analüüsiks kasutati GelCompar II (Applied Maths BVBA, Belgia). Andmestiku korrastamisel järgiti Lenskaja (2014) kirjeldatud protokoll. Dendrogrammi koostamisel kasutati densitomeetriliste kõverate põhiste Pearson'i produkt-moment korrelatsiooni sarnasuse koefitsienti, 0,35% optimisatsiooniga. Sarnasusmaatriks leiti aritmeetilisi keskmisi kasutatavat kaalumata paaride meetodit (UPGMA).

### 2.2.8 Geenifragmendi klooniraamatukogude koostamine

DNAlt amplifitseeritud geenifragmendid puhastati geelist kasutades QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) ja ligeeriti vektorisse pTZ57R/T kasutades InsTAclone™ PCR Cloning Kit-i (Thermo Scientific™, Leedu) järgides tootjapoolset protokoll.

Ligaasisegu (10µl) sadestati 25 µl 96% etanooli ja 1 µl 5M NaCl lahuse lisamisega. DNA



sadenemiseks asetati proovid 20 minutiks -20 °C juurde, seejärel tsentrifuugiti 15 minutit 4 °C juures 13 000 x g ning pesti kaks korda 150 µl 70% etanooliga. Saadud sade kuivatati ning võeti üles 5 µl mQ vees.

Sadestatud ligaasisegu viidi elektroporatsiooni teel *E. coli* DH5α kompetentsetesse rakkudesse. Kompetentsete *E. coli* rakkude saamiseks külvati 120 µl üleöö kasvatatud rakukultuuri 5 ml LB-vedelsöötmesse ning kasvatati 2 tundi 37 °C juures. Seejärel eraldati rakud söötmest tsentrifuugimise teel 13 000 x g 1 minut. Saadud rakumassi pesti kaks korda külma 500 µl steriilse mQ veega ja kaks korda külma 200 µl 10% glütserooliga. Peale seda suspendeeriti rakud 50 µl 10% glütseroolis.

Kompetentsetele rakkudele lisati 2,5 µl sadestatud ligaasisegu ning pipeteeriti elektroporatsiooniküveti. Elektroporatsioon viidi läbi “BioRad” elektroporaatoriga “*E. coli* pulser” pingel 2500 V. Peale elektroporeerimist valati küveti LB söödet proovi ühtlustamiseks ning kallati tagasi katseklaasi. Seejärel kasvatati rakke tund aega 37 °C juures ning peale seda kontsentreeriti rakud tsentrifuugimisega ning plaaditi LB-tardsöötmele, kuhu oli selekteerimise eesmärgil lisatud ampitsilliini (Amp, 150 µg ml<sup>-1</sup>), isopropüül-β-D-tiogalaktopüranosiidi (40 µg ml<sup>-1</sup>) ja 5-bromo-4-kloro-3-indolüül-β-D-galaktopüranosiidi (40 µg ml<sup>-1</sup>) ning kasvatati üleöö 37 °C juures. Kloneerimise õnnestumist kontrolliti sini-valge testi abil. Edasises töös kasutati valgeid kolooniaid.

Väljavalitud bakterikolooniad külvati steriilse tikuga Amp-ga LB-tardsöötmega tassile ning kasvatati 37 °C juures üleöö. Insertsiooniga vektori olemasolu kontrolliti vektori praimeritega (Tabel 1) läbi viidud PCR reaktsiooniga. LB-Ampi-tardsöötmele üleöö kasvanud rakke lisati PCR segusse steriilse pipetiotsikuga. PCR tulemust kontrolliti geelelektroforeesiga (2.2.4).

## 2.3 Tulemused ja arutelu

Läänemerd iseloomustab tihe inimasustus rannikualadel, aktiivne laevaliiklus merel ja vilgas kaubandustegevus arvukates kaubasadamates, mis on põhjustanud Läänemere saastumise erinevate naftasaaduste ning tööstusest ja põllumajandusest pärit kemikaalidega (Rheinheimer, 1998). Bakteritel on oluline roll nende kahjulike ainete kõrvaldamisel mere ökosüsteemist (Reunamo, 2015). Kuigi Läänemere mikroobikoosluste liigilist mitmekesisust on käsitletud paljudes teadusartiklites (Edlund *et al.*, 2008; Koskinen *et al.*, 2011; Riemann *et al.*, 2008; Rieck *et al.*, 2015), on senini vähe uuritud nende kataboolset potentsiaali erinevate naftast pärinevate ja teiste kemikaalide lagundamisel. Senised uuringud on käsitlenud naftasaaduste lagundamist soojal perioodil (Reunamo, 2015; Viggor *et al.*, 2013; Reunamo, 2013; Vedler *et al.*, 2013). Kuna tegemist on põhjapoolse külmema kliimaga alaga, mis aeglustab nafta bioremediatsiooni, on ka oluline uurida naftasaaduste bioloogilist lagunemist ja selles osalevaid mikroobikooslusi külmal perioodil.

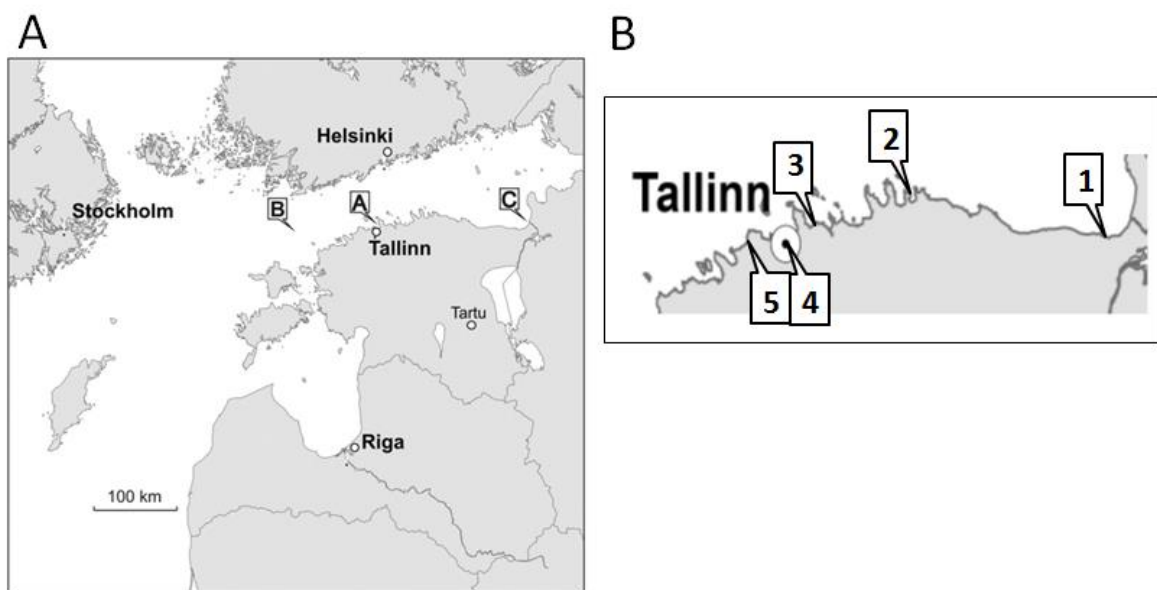
2015. aastal algatati kolme riigi (Eesti, Soome, Venemaa) ühisprojekt OILMICROB (ERA-NET RusPlus Programm). Projekti eesmärgiks oli hinnata Läänemere mikroobikoosluste naftasaaduste kataboolset potentsiaali nii pinnavee proovides kui ka setetes külmal ja soojal perioodil (suvi ja talv). Lisaks seati eesmärgiks isoleerida mikroobe, keda oleks võimalik kasutada tulevikus naftareostuse likvideerimisel. Käesolev bakalaureusetöö on osa OILMICROB projektist ning eesmärgiks on uurida Läänemerest 2016. aasta talvel võetud proovidest isoleeritud bakteritüvede alkaanide ja aromaatsete ühendite lagundamise kataboolset potentsiaali.

### 2.3.1 Proovipunktide kirjeldus

2016. aasta jaanuaris võeti vee- ja sedimendi proovid kolmest Läänemere piirkonnast (Joonis 5A) - Tallinna lahest (A), avamerelt (B) ja Narva lahest (C). Tallinna lahest võeti veeproov umbes 6 km kauguselt Tallinna sadamast, tiheda mereliiklusega piirkonnast. Proovipunkt C asub kahe kilomeetri kaugusel Narva jõe suudmest, mistõttu on see teistest enam mõjutatud magevee sissevoolust. Avamerelt võetud proovipunkt (B) asus kõige kaugemal rannikust, tihedatest laevateedest eemal.

Lisaks võeti vee- ja sedimendiproovid viiest punktist rannikul: Sillamäe, Käsmu, Muuga, Tallinn ja Vääna-Jõesuu (edaspidi kasutatakse tekstis lühidalt vaid nimetust Vääna) (Joonis 5B). Sillamäe, Muuga ja Tallinna proovipunktide puhul on tegemist sadama piirkondadega,

kus toimub aktiivne laevaliiklus. Tallinna sadam koosneb kauba- ja reisisadamate kompleksist, mis tegeleb kaupade käitlemise, reisijate teenindamise ja laevandusega ning on üks suurimaid sadamate komplekse Läänemere ääres. Muuga sadam on suurim, kaasaegseim ja sügavaim kaubasadam Eestis, olles üks Euroopa moodsamaid sadamaid. Muuga sadamas lastitakse ja ladustatakse toornaftat, naftasaadusi ja teisi transiitkaupu (<http://www.ts.ee/tutvustus>). Sillamäe sadam on täielikult renoveeritud Eesti suuruselt teine merekaubasadam, mille struktuurid võimaldavad kõikide kaubagruppide käsitlemist alates naftatoodetest kuni konteinerkaupadeni. Eeldades, et sadamate lähikonnas on vesi rohkem reostunud, võeti võrdluseks veeproovid ka eeldatavalt puhastelt rannikualadelt Käsmust, mis on Lahemaa rahvusparki ala ja Väänast, mis on avalik rand.



Joonis 5. Töös uuritud proovipunktide asukohad.

Paneel A. Avamere proovipunktid (A- Tallinna laht, B - avameri, C - Narva laht).

Paneel B. Ranniku vee- ja sedimendi proovipunktid (1 - Sillamäe, 2 - Käsmu, 3 - Muuga, 4 - Tallinn, 5 - Vääna-Jõesuu).

Läänemere keskmine soolsus, mis Taani väinades on umbes 10–35‰ väheneb Läänemere keskosa suunas (6–8‰) ning kahaneb veelgi Soome ja Põhjalahe sopi suunas, jäädes vahemikku 3–6‰ (Sjöqvist *et al.*, 2015). Käesolevas töös uuritud proovipunktides jäi soolsus vahemikku 3,4–6,7‰. Kõige suurem soolsus (6,7‰) oli avamerelt võetud proovipunktis (B) ning madalaim (3,4‰) Narva lahes (C), kuhu suubub Narva jõgi. Rannikuäärsete proovipunktide soolsused jäid vahemikku 4–6‰ (Tabel 2).

**Tabel 2.** Töös kasutatud proovide analüüside tulemused. Alkaanide kontsentratsioonid ja 16S rRNA geeni koopiate arvukus määrati projekti OILMICROB koostööpartneri poolt (Yan *et al.*, 2018).

Koht	Tähis	Kirjeldus	Juhtivus (mS m <sup>-1</sup> )	Soolsus (‰)	pH	C10- C40	C10- C21	C21- C40	16S rRNA geeni koopiate arvukus (koopiat g <sup>-1</sup> kuivaine kohta või koopiat L <sup>-1</sup> )
						(mg kg <sup>-1</sup> või mg L <sup>-1</sup> )			
Tallinna laht	A	avameri	1061	6,0	–	0	0	0	4,43±2,54x10 <sup>8</sup>
Avameri	B	avameri	1176	6,7	–	0	0	0	2,41±0,33x10 <sup>8</sup>
Narva laht	C	avameri	625	3,4	–	0	0	0	4,63±1,89x10 <sup>8</sup>
Sillamäe	1V	vesi	700	4,0	8.5	0	0	0	4,20±1,88x10 <sup>8</sup>
Käsmu	2V	vesi	940	5,7	7,7	0	0	0	2,98±0,78x10 <sup>8</sup>
Muuga	3V	vesi	900	4,3	7,8	0	0	0	5,51±3,51x10 <sup>8</sup>
Tallinn	4V	vesi	990	5,2	8,0	0	0	0	7,18±3,90x10 <sup>8</sup>
Vääna	5V	vesi	990	6,0	7,6	0	0	0	4,13±3,15x10 <sup>8</sup>
Sillamäe	1S	sediment	36	–	7,4	0	0	0	5,94±0,719x10 <sup>7</sup>
Käsmu	2S	sediment	89	–	6,6	220	0	130	5,32±0,71x10 <sup>9</sup>
Muuga	3S	sediment	38	–	7,5	0	0	0	4,62±1,83x10 <sup>7</sup>
Tallinn	4S	sediment	64	–	8,9	24	0	19	4,31±0,90x10 <sup>7</sup>
Vääna	5S	sediment	37	–	8,7	0	0	0	1,31±0,236x10 <sup>8</sup>

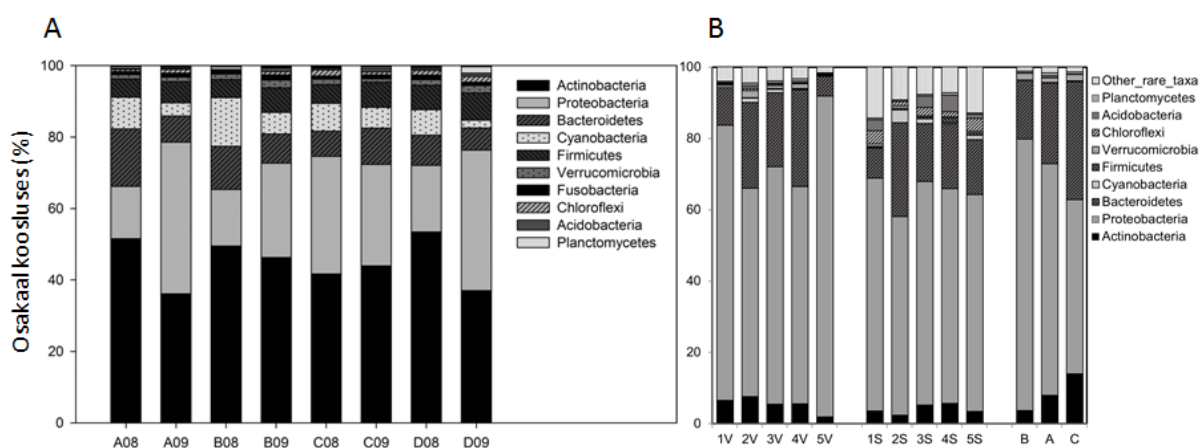
“–” parameetrit ei määratud; “0” - määratud parameeter on madalam määramispiirist; 16S rRNA geenifragmendi arvukused on esitatud keskmine±standardhälve.

Naftareostuse kindlaks tegemiseks määrati proovipunktidest võetud vee- ja sedimendi proovidest summaarne alkaanide kontsentratsioon (C10-C40) ja eraldi fraktsioonide C10-C21 ja C21-C40 kontsentratsioonid (Tabel 2). Kõikide proovipunktide puhul, v.a Käsmu (proovipunkt 2) ja Tallinna (proovipunkt 4) sedimendiproovides, jäid tulemused määramispiirist madalamale. Tallinna sadama lähedalt võetud sedimendiproovis saadi alkaanide summaarseks kontsentratsiooniks (C10-C40) 24 mg kg<sup>-1</sup> ja fraktsiooni C21-C40 kontsentratsiooniks 19 mg kg<sup>-1</sup>, mis viitab naftareostuse esinemisele. Käsmu proovipunkt, mis asub Lahemaa rahvusparki alal suurtest laevateedest ja sadamatest eemal ning oli eeldatavalt kõige vähem reostunud, määrati sedimendiproovis kõige kõrgem alkaanide sisaldus (Tabel 2). Alkaanide C10-C40 ja C21-C40 kontsentratsioonideks määrati vastavalt 220 mg kg<sup>-1</sup> ja 130 mg kg<sup>-1</sup>. Võib oletada, et tegemist ei ole mitte naftareostuse vaid lagunevatest vetikatest

pärinevate alkaanidega, sest jää alt võetud proov koosnes suures enamuses surnud vetikate biomassist.

Bakterite 16S rRNA geeni koopiate arvukus määrati proovides kasutades RT-PCR meetodit (Tabel 2). Kõikides veeproovides, nii avamere kui ranniku proovipunktide, saadi sarnased väärtused, mis jäid suurusjärku  $10^8$  koopiat  $L^{-1}$ . Samas sedimendiproovides olid erinevused suuremad. Kõige suurem arvukus mõõdeti Käsmu sedimendiproovis ( $10^9$  koopiat  $g^{-1}$ ) samas kui sadama piirkondades (Sillamäe, Tallinn, Muuga) jäid arvukused suurusjärku  $10^7$  koopiat  $g^{-1}$ . Kõrgem arvukus Käsmu sedimendiproovis võib olla seotud sellega, et see sisaldas erinevalt teistest rohkelt surnud vetikate biomassi. 2008. ja 2009. aasta augustis ja septembris kogutud avamere veeproovides (käesoleva tööga kattuvad proovipunktid A, B ja C) saadi kasutades RT-PCR metoodikat mikroobide arvukused samuti  $10^8$  koopiat  $L^{-1}$  (Tiirik *et al.*, 2014), mis lubab oletada, et üldine mikroobide arvukus ei sõltu väga oluliselt aastaajast.

Käesoleva töö käigus määrati ka kultiveeritavate bakterite arvukusi nii R2A agarplaatidelt kui ka minimaalsöötme selektiivtassidelt (substraadina kasutati naatriumsalitsülaati, fenooli, heptaani, heksadekaani, diiselkütust või toornaftat). Veeproovides (avamere ja ranniku) jäid arvukused R2A söötme tassidel suurusjärku  $10^4$  CFU  $ml^{-1}$  ning selektiivtassidel vahemikku  $10^2$ - $10^3$  CFU  $ml^{-1}$ . Sedimendiproovides olid arvukused kõrgemad, R2A tassil vastavalt  $10^5$  CFU  $ml^{-1}$  ning substraadiga tassidel suurusjärgus  $10^3$  CFU  $ml^{-1}$ . Kultiveeritavate mikroobide madal arvukus võrreldes DNA-põhise arvukuse määramise meetodil saadud väärtustega näitab kui vajalik on bakterite kasvatamise tingimuste uurimine ja täiustamine.



Joonis 6. Läänemere bakterikoosluste mitmekesisus hõimkondade tasemel suvisel ja talvisel perioodil. Paneel A - 2008. ja 2009. aasta suvel võetud avamere veeproovide bakterikooslused hõimkondade tasemel (Tiirik *et al.*, 2014). A - Tallinna laht; B - avameri; C - Narva laht; D - Liivi laht. Paneel B - 2016. aasta talvel võetud vee- ja sedimendi ning avamere proovide kooslused hõimkondade tasemel (avaldamata andmed, OILMICROB). 1 - Sillamäe; 2 - Käsmu; 3 - Muuga; 4 - Tallinn; 5 - Vääna; A - Tallinna laht; B - avameri; C - Narva laht. V - rannikuäärne veeproov; S - rannikuäärne sediment.

2016. aasta talvel kogutud vee- ja sedimendi proovide mikroobikoosluste uurimiseks analüüsiti bakteriaalse 16S rRNA geeni järjestuste amplikone (metoodika Yan *et al.*, 2018., praimerid (5'-3') 341F\_Illum ATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGACTC CTACGGGAGGCAGCAG; 806R\_Illum GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTGGACTACHVGGGTWTCTAAT, avaldamata andmed, OILMICROB). Domineerivateks hõimkondadeks olid *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* ja *Actinobacteria* (Joonis 6). Kõige suurema osa moodustasid *Proteobacteria* esindajad, kelle osakaal erinevate proovipunktide kooslustes jäid vahemikku 50-90%. Tiirik *et al.* 2014 uurimistöö tulemused 2008. ja 2009. aasta suvel võetud Tallinna, Narva, Soome ja Liivi lahe veeproovidest näitasid, et soojal perioodil domineerivad hõimkonnad *Actinobacteria* ja *Proteobacteria* ning arvukamalt leidub veel *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria* ja *Firmicutes* hõimkondade esindajaid. Talve- ja suveperioodi proovide tulemuste võrdlemisel on märgata olulist muutust hõimkondade *Actinobacteria* ja *Proteobacteria* suhtelistes arvukustes. Kui suvel domineerivad *Actinobacteria* esindajad (umbes 50% kooslusest), siis talvel nende osakaal langeb oluliselt (kuni 10% kooslusest) ning domineerivaks saavad *Proteobacteria* esindajad. Võrreldes suveperioodiga on talvel hõimkonna *Bacteroidetes* osakaal poole võrra suurem, moodustades umbes 20% kooslusest. Saadud tulemused näitavad, et samal ajal erinevatest proovipunktidest võetud veeproovide mikroobikooslused on omavahel sarnased. Talvel kogutud sedimendiproovide liigiline rikkus on suurem kui sama perioodi veeproovidel, kuid domineerivad bakterihõimkonnad on kõikides rannikuäärsetes proovipunktides samad ning sarnase osakaaluga (Joonis 6).

Soolsus on peamine tegur, mis kontrollib elustiku jaotumist veekeskkonnas ning enamus veeorganisme on kohanenud eluks kas soolases või magedas vees (Herlemann *et al.*, 2011). Üldiselt on leitud, et klasside *Alpha*- ja *Gammaproteobacteria* osakaal soolsuse gradiendi tõustes kasvab, samal ajal kui näiteks *Betaproteobacteria* osakaal väheneb (Bouvier ja del Giorgio, 2002; Rieck *et al.*, 2015). Madalama soolsusega piirkondades domineerivad aga *Actinobacteria* ja *Betaproteobacteria* ning soolsuse tõustes muutuvad dominantseteks *Alpha*- ja *Gammaproteobacteria* esindajad (Herlemann *et al.*, 2011). Soome koostööpartnerite poolt saadud tulemustes kajastub sarnane seaduspära avamerelt võetud veeproovides (Joonis 6). Proovipunktis C, kus soolsus oli kõige madalam (3,4‰) (Tabel 2), oli *Actinobacteria* osakaal mitu korda suurem ning *Proteobacteria* esindajate hulk tunduvalt väiksem võrreldes avamerelt võetud veeprooviga, kus soolsus oli poole võrra kõrgem (6,7‰). Samuti näitas meie töörühmas varem läbiviidud uuring, et soolsus on oluline mõjutegur Läänemere pinnavee bakterikoosluste *alkB* geeni mitmekesisusele (Viggor *et al.*, 2015).

Mitmetel keskkonnateguritel (vee soolsus, temperatuur, naftasaaduste kontsentratsioon, jääkate merel jne.) on väga oluline roll mere mikroobikoosluste kujunemisele. Kuidas ja kas need tegurid mõjutavad mikroobikoosluste võimet lagundada erinevaid naftasaadusi, vajab veel uurimist.

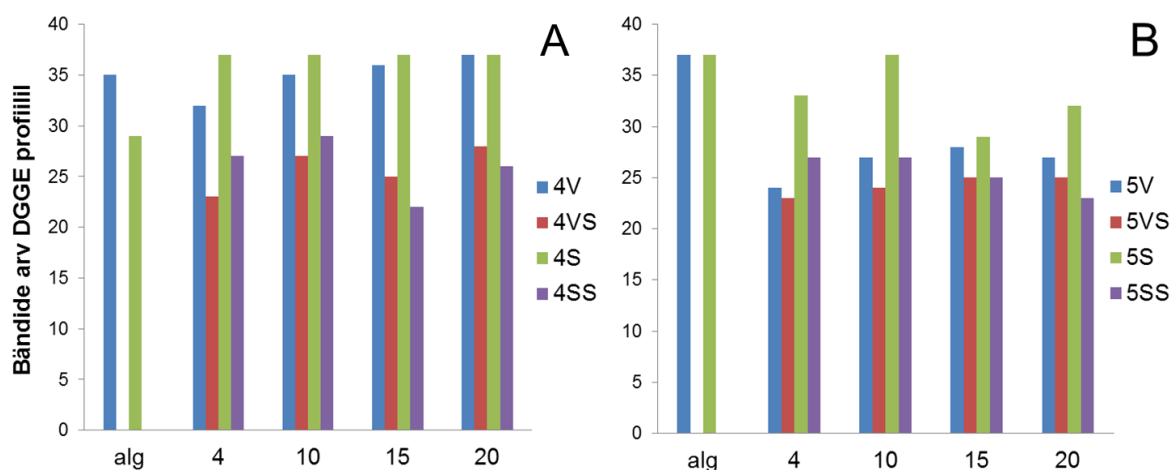
### **2.3.2 Toornafta ja temperatuuri mõju mikrokosmide bakterikooslustele - 16S rRNA geenifragmendi järjestuste DGGE profiilide analüüs**

Kütusereostus on üks võimalikest Läänemerel toimuda võiva õnnetuse tagajärgedest, mille käigus võib keskkonda sattuda väga suurtes kogustes ohtlike ühendeid. Selgitamaks Läänemere mikroobikoosluste mitmekesisuse muutumist kui kasvukeskkonda on lisatud toornaftat (1% lõppkontsentratsioon), viidi käesolevas töös läbi mikrokosmi katsed ning koosluste analüüsiks kasutati 16S rRNA geenifragmendi DGGE (denatureeriva gradiendiga geelelektroforees) analüüsi (Joonis 8). Katsetes kasutati Tallinna sadama-alalt (4) ja Vääna rannast (5) võetud vee- (V) ja sedimendi (S) proove. Temperatuuri mõju hindamiseks inkubeeriti kolbe nelja erineva temperatuuri, kas 4°C, 10°C, 15°C või 20°C juures.

DGGE geelipildilt eristuvad selgesti algse mereveeproovi (Joonisel 8 märgitud rohelisega) koosluste “sõrmejälg” mustrid mikrokosmide koosluste mustritest. Eristumine on märgatav bändide intensiivsuse, asetuse kui ka arvu poolest (Joonis 7 ja 8).

Toornafta lisamisel vähenes kõikides katsetes (4VS, 4SS, 5VS ja 5SS) bakterikoosluste mitmekesisus märgatavalt - vähenes bändide arv (Joonis 7) ning tekkisid dominantsed bändid, mis osaliselt kattusid sama proovi toornaftata katse (4V, 4S, 5V ja 5S) koosluste dominantsete bändide asukohtadega (Joonis 8). DGGE geelipildi korrastatud andmestikult programmiga GelCompar II koostatud dendrogrammilt on näha, et proovipunkti piires nii vee- kui ka sedimendiproovide toornaftata ja toornaftaga koosluste profiilid klasterduvad lähedastesse klastritesse (Joonis 8).

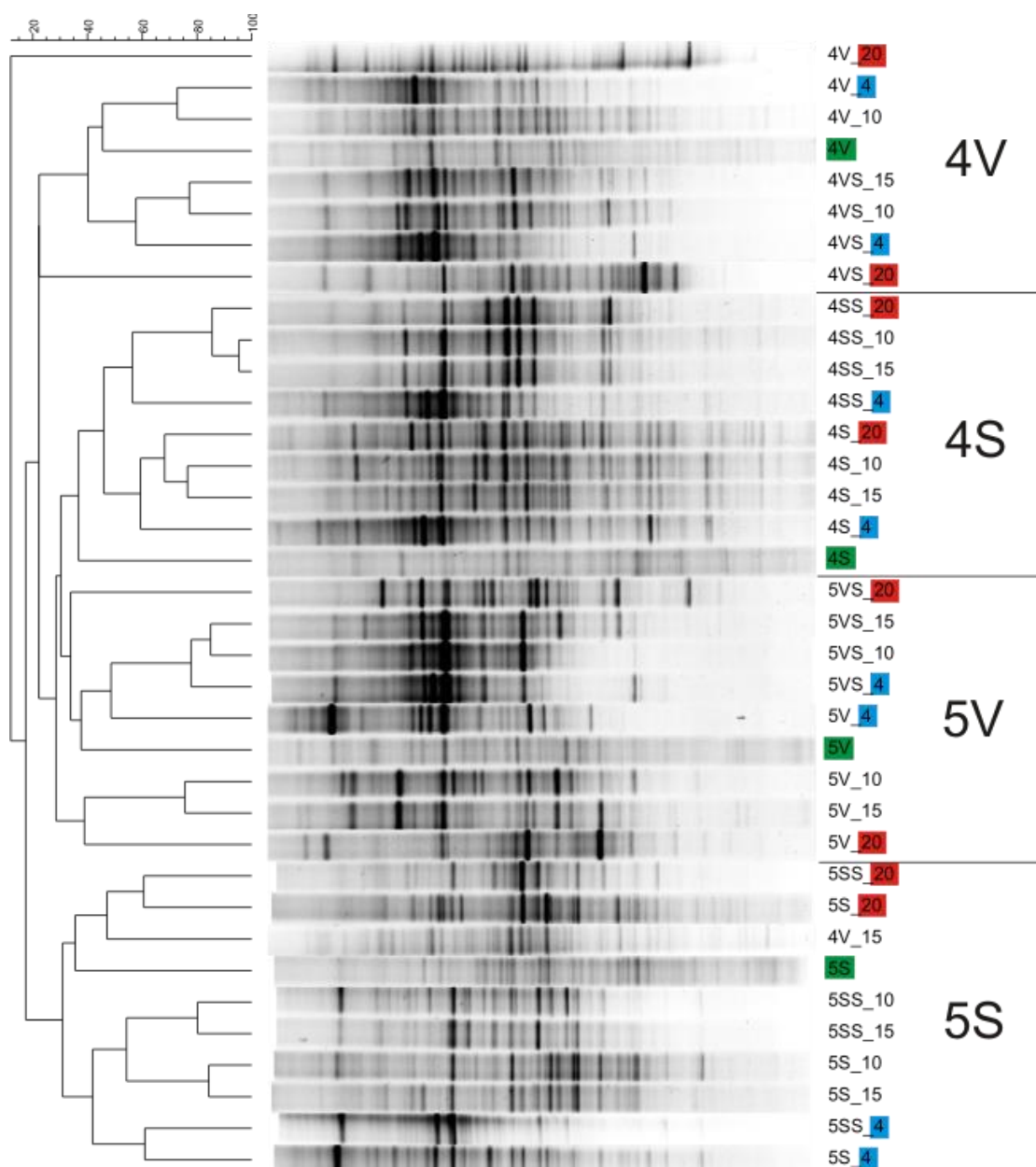
Mitmekesisuse vähenemist on näidatud ka meie töörühma varasemas artiklis (Viggor *et al.*, 2013), kus katsete rikastamisel diiselkütuse, põlevkiviõli ja toornaftaga, langes koosluste mitmekesisus kõige rohkem. Tulemused ühtivad ka teiste töörühmade andmetega, mis tõestavad, et selektiivse surve tulemusel väheneb mikroobikoosluste mitmekesisus ning on soodustatud spetsiifiliste bakterikoosluste tekkimine (Ogino *et al.*, 2001; Röling *et al.* 2002; Reunamo, 2015).



Joonis 7. 16S rRNA geeni DGGE geeli korrastatud andmestiku analüüsil tuvastatud bändide arv Läänemere mikroobikoosluste (alg) ning erinevatel temperatuuridel läbi viidud mikrokosmide koosluste profiilidelt. Paneelidel A ja B on näidatud vastavalt Tallinna ja Väana proovipunkti mikrokosmide profiilidelt saadud andmed (4 - Tallinn, 5 - Väana; V - veeproov, VS - veeproov + toornafta, S - sedimendiproov + steriilne merevesi, SS - sedimendiproov + steriilne merevesi + toornafta).

Koosluse dünaamikas on oluliseks teguriks ka temperatuur. DGGE geelipildilt (Joonis 8) on näha, et sama proovi inkubeerimisel erinevatel temperatuuridel on dominantsete bändide asetus erinev. Kõige enam erinevad üksteisest 4 °C ja 20 °C juures kasvanud mikrokosmide kooslused, nende profiilid paiknevad dendrogrammil reeglina üksteisest kaugemal. Bändid, mis domineerivad 4 °C juures on reeglina vähem intensiivsed 20 °C juures ning on lisandunud teistsuguse asetusega domineerivad bändid. Samas vee- ja sedimendiproovide kooslused, mis kasvasid 10 °C ja 15 °C juures, olid omavahel kõikides katsetes sarnased ning paiknevad dendrogrammil lähestikku. Kuigi temperatuur on oluline mikroobikooslusi mõjutav tegur, on mõned bakteriliigid laiema temperatuurioptimumiga kui teised. Seda on näha ka mikrokosmikatsetest eraldatud koosluste DGGE profiilidelt, kus mõned dominantsed bändid on vaadeldavad kõikidel kasutatud temperatuuridel. Sarnase tulemuse said oma uurimistöös Coulon *et al.*, 2007, kui 2004. aasta novembris kogutud Thamesi jõe veega viidi läbi mikrokosmide katsed 4, 12 ja 20 °C juures, kuhu oli lisatud toornaftat. 7 päeva möödudes olid bakterite arvukused kõige kõrgemad 20 °C juures inkubeeritud mikrokosmides. Koosluste 16S rRNA geeni fülogeneetiline analüüs näitas, et mõned perekonnad nagu *Thalassolituus*, *Cycloclasticus* ja *Roseobacter* olid esindatud nii 4 kui ka 20 °C juures läbiviidud mikrokosmides, mis tõestas nende head temperatuuri taluvust. *Oleispira antarctica* 16S rRNA järjestusega 98% ulatuses identsed järjestused domineerisid ainult 4 °C katsetes ning nimetatud baktereid võiks kasutada külmas kliimas naftasaaduste bioremediatsioonis.





Joonis 8. 2016.a talvel kogutud Tallinna lahe (4) ja Vääna (5) vee (V)- ja sedimendi (S) proovide (algsed proovid tähistatud rohelisega) ning nendega 4 (tähistatud sinisega), 10, 15 ja 20 °C (tähistatud punasega) juures läbiviidud mikrokosmide (toornaftata ja 1% toornaftaga) koosluste 16S rRNA geenifragmentide DGGE (denatureeriva gradiendiga geelelektroforees) analüüsi põhjal koostatud dendrogramm ja korrastatud andmestik. V - veeproov; VS - veeproov + substraat; S - sedimendiproov + steriilne merevesi; SS - sedimendiproov + steriilne merevesi + substraat.

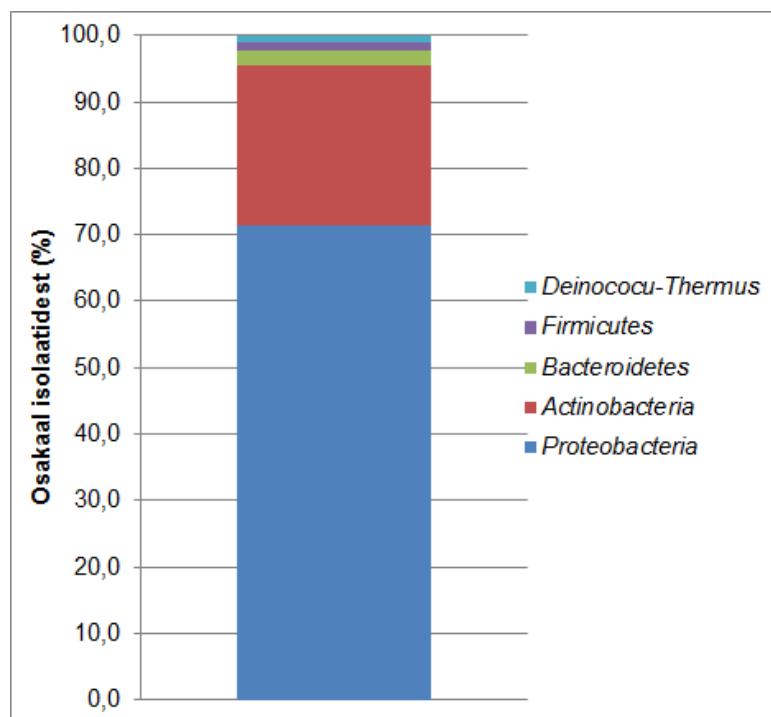
Ka perekonda *Rhodococcus* kuuluvad liigid on võimelised lagundama naftasaadusi nii külmas Arktikas (Eriksson *et al.*, 2001), kui ka soojas merevees (Carla *et al.*, 2005).

Temperatuuril on oluline roll ka bakterite ainevahetuse kiirusele. Samuti mõjutab see naftasaaduste lagundamist, muutes nafta keemilisi ja füüsikalisi omadusi ja seeläbi ka selle biodegradatsiooni. Seetõttu on oluline uurida naftat lagundavate bakterite kooslusi ning

kuidas temperatuur mõjutab selle toimimist, et koostada uusi teadmistepõhiseid strateegiaid saastatud alade tõhusamaks bioloogiliseks puhastamiseks.

### 2.3.3 Tüvede isoleerimine ja identifitseerimine

2016. aasta jaanuaris kogutud proovidest eraldati kokku 91 morfoloogiliselt erinevat bakteritüve, millest 73 tüve isoleeriti vee- ja sedimendiproovide otsekülvidest selektiivtassidele ning 18 tüve mikrokosmidest (Lisa 4A, 4B, 5A ja 5B). Isoleeritud tüvede 16S rRNA geeni nukleotiidseid järjestusi (403-460 ap) võrreldi BLAST otsingumootoriga GenBank andmebaasis leiduvate nukleotiidsete järjestustega (Lisa 4A, 4B, 5A ja 5B).



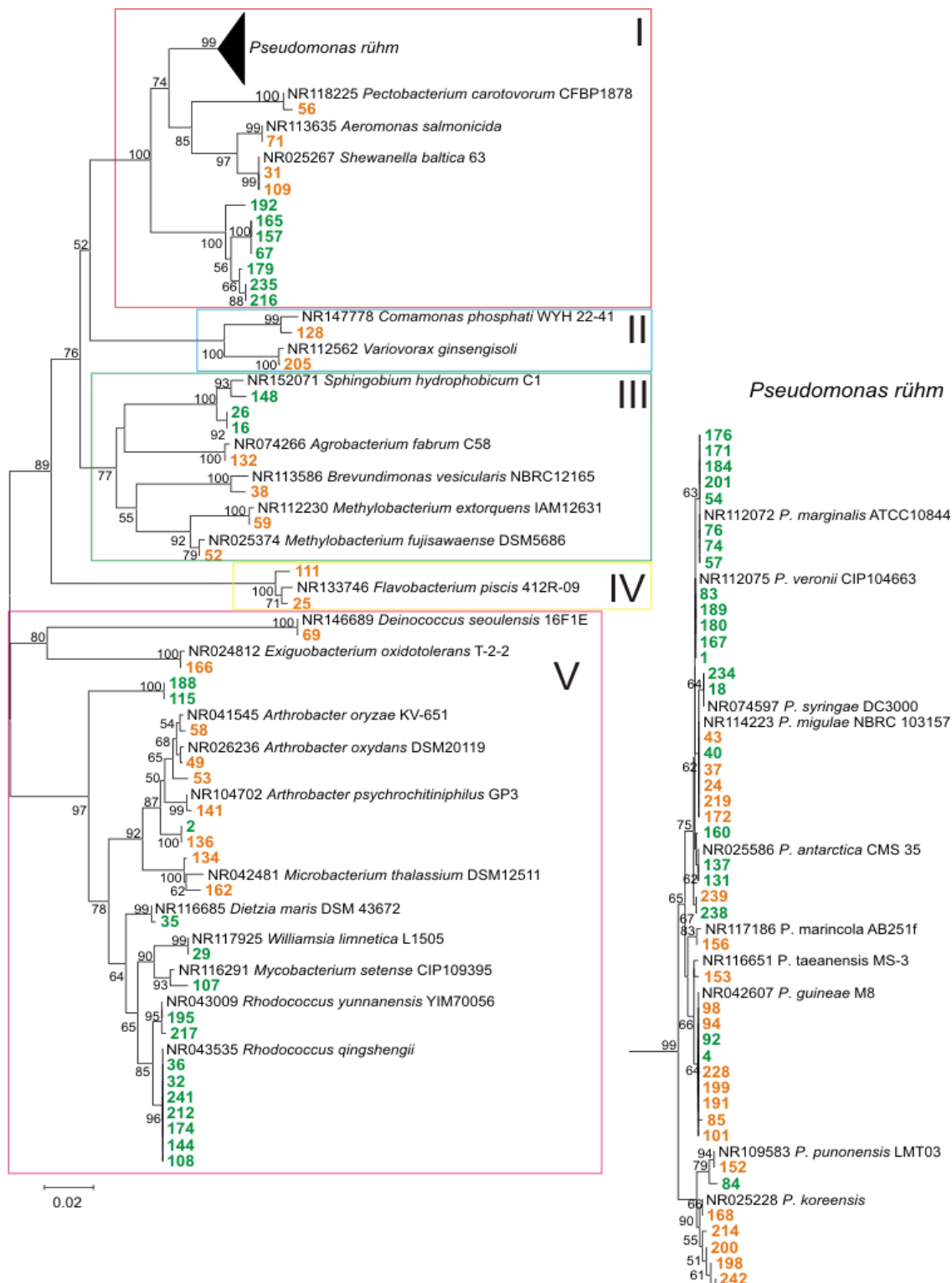
Joonis 9. Isolaatide 16S rRNA geenifragmendi järjestuste võrdlemisel GenBank andmebaasist leitud lähimate vastete fülogeneetiline kuuluvus hõimkondade lõikes.

Tulemustest selgus, et kõige suurema osa (71%) isoleeritud tüvedest kuulusid hõimkonda *Proteobacteria* (Joonis 9), kellest valdav enamus (86%) olid klassi *Gammaproteobacteria* esindajad ning neist omakorda 80% kuulusid perekonda *Pseudomonas*. Suuruselt teine hõimkond oli *Actinobacteria* (24% kõigist isolaatidest), kus domineerisid perekonda *Rhodococcus* kuuluvad liigid. Mitmed uurimused on näidanud, et just klassi *Gammaproteobacteria* esindajad on peamised õli lagundajad mere bakterikooslustes (Wang *et al.* 2010; Head *et al.* 2006; Baelum *et al.* 2012). Samas aktinobakterid on peamised naftasaaduste lagundajad mullas (Chikere *et al.* 2009; Alvarez *et al.* 2011).

Võrreldes projekti OILMICROB Soome partnerite analüüsitud koosluste (Joonis 6B) ja käesoleva töö isolaatide (Joonis 9) 16S rRNA geeni järjestuste andmeid, on näha, et domineerivad hõimkonnad kattuvad. Samas on isoleeritud tüvede mitmekesisus palju väiksem, sest need eraldati agarplaadil kasvavatest kolooniast. Suur osa merebakteritest pole kultiveeritavad (Simu *et al.* 2005) ning seetõttu on mitmekesisus isolaatide seas madalam kui DNA-põhist koosluse analüüsimeetodit kasutades.

Käesoleva töö käigus koostati isoleeritud tüvede 16S rRNA geenifragmentide (403-460 ap) ja GenBank andmebaasist võetud referentsjärjestuste põhjal fülogeneetiline puu (Joonis 10). Bakteritüvede järjestused moodustasid fülogeneetilisel puul viis klastrit. Esimesse nelja klastrisse (I, II, III, IV) kuulusid gramnegatiivsed ning viiendasse klastrisse (V) grampositiivsed bakterid. Gramnegatiivsetest bakteritest olid esindatud klassid *Gamma*- (I klaster), *Beta*- (II), *Alphaproteobacteria* (III) ning *Flavobacteria* (IV).

Toornafta erinevate komponentide lagundamisvõime selgitamiseks kasvatati isolaate naatriumsalitsülaati (SAL), fenooli (PHE), tolueni (TOL) või heksadekaani (Hd) sisaldavatel minimaalsöötme tassidel. Kasvu hinnati moodustunud biomassi hulga järgi (võrreldes kasvuga substraadita minimaalsöötme tassil (Lisa 4A, 4B, 5A ja 5B). Vähemalt ühel substraadil hästi kasvanud tüvedel testiti alifaatsete ja/või aroomaatsete süsivesinike lagundamiseks vajalike kataboolsete geenide olemasolu. Kõikidest (91) uuritud bakteritüvedest tuvastati 49 isolaadil (Joonis 10, rohelised numbrid) üks või enam järgnevatest kataboolsetest geenidest: alkaani hüdroksülaasid (*alkB*; *alkM*); flaviinseonduv alkaani monooksügenaas (*almA*); multikomponentne fenooli hüdroksülaas (LmPH); katehhooli 2,3-dioksügenaas (C23O), katehhooli 1,2-dioksügenaas (C12O). 42 tüvel (Joonis 10, oranžid numbrid) ei õnnestunud eelnevalt nimetatud geene olemasolevate praimeritega tuvastada, edaspidi kasutatakse nende tüvede korral nimetust kataboolsete geenideta tüved (Lisa 5A ja 5B). Kataboolsete geenide tuvastamine kasutatud praimeritega (Tabel 1) õnnestus enamasti bakteritüvedega, kes kuuluvad tuntud kataboolsete omadustega perekondadesse nagu näiteks *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacteria*, *Sphingomonas* jt (Lisa 4A ja 4B). Samas ei leitud ligi pooltel, enamasti salitsülaadil või heksadekaanil hästi kasvanud *Pseudomonas* perekonda kuuluvatel tüvedel ühtegi eelnevalt nimetatud kataboolset geeni (Lisa 5B). Ühelt poolt lubab see oletada, et Läänemere mikroobikooslused on erinevad seni kirjeldatutest, kuid samas on oluline roll ka kasutatud praimeritel. Molekulaarbioloogiliste meetodite areng ning genoomide sekveneerimise andmete hulga suurenemine annab võimaluse uurida ka vähe uuritud mikroobide kataboolsete geenide mitmekesisust.



Joonis 10. 16S rRNA geenifragmendi järjestuste (403-460 ap) põhjal koostatud fülogeneetiline puu. Rohelised numbrid tähistavad kataboolsete geenidega ning oranžid numbrid kataboolsete geenideta isolaate. Klasterite numbrid märgivad *Gamma*- (klaster I); *Beta*- (klaster II); *Alphaproteobacteria* (klaster III) ja *Flavobacteria* (klaster IV) klasse ning klaster V Gram-positiivseid baktereid. GenBank andmebaasist võetud referentsjärjestuste puhul on märgitud vastava tüve GenBank ID number ja bakteri nimi. I klasteris kolmnurgana märgitud *Pseudomonas* rühm on eraldi välja toodud joonise paremale küljele. Fülogeneetiline puu on koostatud lähinaabrite ühendamise meetodil. Bootstrap väärtused on märgitud alates 50%. Mõõtkava vastab 0,05 ap asendusele ühe ap kohta.

### 2.3.4 Alkaanide lagundamisel osalevate võtmeensüümide tuvastamine

Isoleeritud 91 tüvest 33 kasvas hästi heksadekaanil (Lisa 4A, 4B, 5A ja 5B), mis viitab nende võimele lagundada alkaane. Alkaanide lagundamiseks on mikroobidel väga erinevaid ensüüme, neist tuntumad ja levinumad on alkaani hüdroksülaasid - leitud on üle 250 homoloogi ning nende esinemist on kirjeldatud umbes 45 bakteriliigis (van Beilen ja Funhoff, 2007). Käesolevas töös kasutati kolme erinevat praimeripaari alkaanide biodegradatsioonil osalevate ensüüme kodeerivate geenide *alkB*, *alkM* ja *almA* tuvastamiseks (Tabel 1).

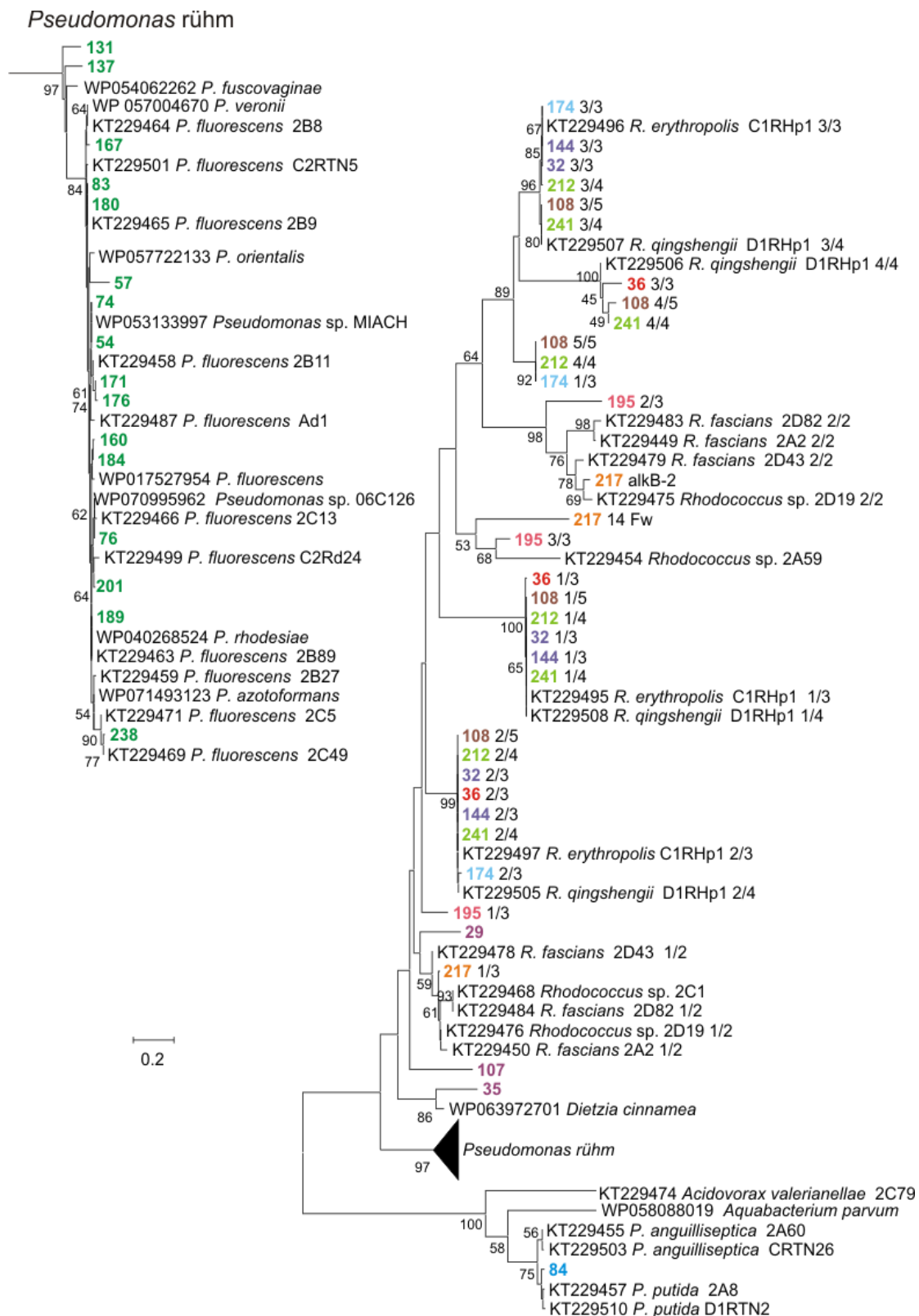
Universaalseid praimereid (Viggor *et al.* 2013) kasutades amplifitseeriti *alkB* geeni järjestused 29 bakteritüvel (Lisa 6 ja 7). Järjestuste sekveneerimisel tuvastati üheksal tüvel topelt piikidega kromatogramm, mis viitas enam kui ühe *alkB* geeni järjestuse olemasolule ühes bakteritüves. Üksikute geenide järjestuste saamiseks puhastati *alkB* geenifragment ning kloneeriti. Kloneeritud järjestuste sekveneerimisel tuvastati kuuel tüvel kolm, kahel tüvel neli ja ühel tüvel viis alkaani hüdroksülaasi geeni (Lisa 7). Ka teiste uurimisrühmade töödes on näidatud, et looduses eksisteerib bakteritüvesid, kellel on korraga mitu erinevat *alkB* geeni. Näiteks perekondadel *Rhodococcus*, *Aquabacterium*, *Alcanivorax* ja *Solimonas* on kirjeldatud mitme *alkB* homoloogi esinemist (Nie *et al.*, 2014; van Beilen *et al.*, 2002; Takei *et al.*, 2008; Whyte *et al.*, 2002). *alkB* geenid võivad paikneda kas kromosoomis (Schneiker *et al.*, 2006) või plasmiidis (van Beilen *et al.*, 1994), mis loob võimaluse horisontaalse geeniülekanne toimumiseks. *alkB* geenide horisontaalset ülekannet erinevatesse perekondadesse kuuluvate bakterite vahel on varem näidatud. Näiteks *Pseudomonas putida* erinevate tüvede alkaani hüdroksülaaside järjestuste uurimisel leiti, et nii geenide järjestused kui ka organisatsioon on sarnased perekonna *Alcanivorax* *alk* geeniklastritega (Reva *et al.*, 2008). Marin *et al.*, 2003 näitasid, et erinevate alkaani hüdroksülaaside esinemine ühes organismis tagab laiemal substraadi spetsiifika.

Korrastatud 51 alkaani hüdroksülaasi järjestused transleeriti ennustatavateks aminohappelisteks järjestusteks (101-106 ah), võrreldi BLAST otsingumootoriga GenBank andmebaasis olevate aminohappeliste järjestustega ning koostati fülogeneetiline puu isoleeritud bakteritüvede ja referentstüvede järjestustest (Joonis 11). Fülogeneetilisel puul moodustasid kõige suurema rühma (17 tüve) perekonda *Pseudomonas* kuuluvad ühe AlkB järjestusega tüved (Lisa 6). AlkB aminohappelisijärjestusi võrreldes leiti liigiliselt kõige lähedasemad vasted järgmistele pseudomonaadidele: *P. protegens*, *P. fluorescens* ja *P. putida*. Heksadekaani aurudes kasvades andsid need uuritud 17 tüve reeglina nõrga kasvujälje (Lisa 4B). Kõige parema kasvujälje heksadekaanil andis tüvi 84, kelle AlkB järjestus oli 98%

identne *P. putida* AlkB järjestusega. Kõige põhjalikumalt ongi uuritud *P. putida* GPo1 tüve, kelle alkaanide lagundamist kodeerivad geenid paiknevad OCT plasmiidis ning on võimeline lagundama alkaane ahela pikkusega C18-C28 (Smits *et al.* 2002).

Tüved 83, 167 ja 180 kuulusid 16S rRNA geeni fülogeneetilise analüüsi alusel liiki *P. veronii*, kuid omasid 98-100% identset *P. fluorescens* AlkB järjestust. Tüvi 137 kuulus 16S rRNA geeni analüüsi põhjal liiki *P. antarctica*, kuid omas 88% identset *P. protegens* AlkB aminohappelist järjestust. Selline erinevus võib viidata bakterite vahelisele horisontaalsele geeniülekandele. (van Beilen *et al.*, 2003). 2008. ja 2009.aasta suvel käesoleva tööga osaliselt kattuvatest proovipunktidest kogutud veeproovidest isoleeritud AlkB järjestust omanud pseudomonaadid jaotusid võrdselt *P. fluorescens* ja *P. anguilliseptica* AlkB järjestustega sarnaste järjestuste rühmadesse (Viggor *et al.*, 2015). Samas talvistes proovides domineerisid tüved, kelle vastavad järjestused olid identsed *P. fluorescens* AlkB järjestustega. Erinevust võib seletada bakteriliikide erineva temperatuuritaluvusega.

AlkB fülogeneetiliselt puul moodustavad teise suure rühma hõimkond *Actinobacteria* perekonda *Rhodococcus* kuuluvate isolaatide AlkB järjestused (Lisa 7; Joonis 11). Kõigil üheksal tüvel esines mitu *alkB* geeni järjestust (kaks kuni viis) ning nad kasvasid väga hästi heksadekaani aurudes (Lisa 4A). GenBank andmebaasis AlkB järjestusi võrreldes saadi liigiliselt lähimad vasted järgmiste rodokokkidega: *R. fascians*, *R. sovatensis*, *R. gingshengii* ja *R. erythropolis* (Lisa 7). Tüvel 36 leiti kolm erinevat AlkB järjestust, millest kaks olid sarnased vastavalt *R. gingshengii* ja *R. erythropolis* AlkB järjestustega. Samas 16S rRNA geeni analüüsi alusel oli nimetatud tüvi lähedane *R. degradans* järjestusega (Lisa 4A). Sarnaselt ülal kirjeldatuga on tõenäoliselt tegemist horisontaalse geeniülekandega, kus üks liik on omandanud teise liigi geenid. Samas tüvi 217 kuulus 16S rRNA geeni fülogeneetilise analüüsi alusel *Rhodococcus fascians* tüvede hulka ning temas tuvastatud kolm erinevat AlkB järjestust olid samuti 94-98% identsed *R. fascians* tüvede AlkB järjestustega. Sarnaselt käesolevale tööle isoleeriti 2008. ja 2009. aasta suvistest proovidest kaheksa tüve, kes kuulusid perekonda *Rhodococcus* ning kuuel neist tuvastati rohkem kui üks *alkB* geen (Viggor *et al.*, 2015). Erinevates kirjandusallikates näidatakse, et mitme erineva alkaani hüdroksülaasi geeni omamine võimaldab *Rhodococcus* liikidel lagundada väga erineva ahela pikkusega alkaane ning lai substraadispekter muudab nad väga efektiivseteks alkaanide lagundajateks keskkonnas (Takei *et al.* 2008; Cappelletti *et al.* 2011; van Beilen *et al.* 2002).



Joonis 11. Tüvede ennustatavate alkaani hüdroksülaasi (AlkB, 101-106 ah) aminohappeliste järjestuste põhjal koostatud fülogeneetiline puu. GenBank andmebaasist võetud järjestuste puhul on märgitud vastava tüve GenBank ID number ja bakteri nimi. Kolmnurgana märgitud *Pseudomonaste* rühm on eraldi välja toodud joonise vasakul poolel. Värviliselt on tähistatud mitut AlkB järjestust omavad tüved. Puu on koostatud lähinaabrite ühendamise meetodil. Bootstrap väärtused on märgitud alates 50%. Mõõtkava vastab 0,2 ah asendusele ühe aminohappe kohta.

Varasemates uuringutes on näidatud perekonda *Rhodococcus* kuuluvate isolaatide väga head temperatuuritaluvust, kusjuures erinevad liigid võivad naftasaadusi lagundada nii külmas Arktikas (Eriksson et al., 2001), kui ka soojas merevees (Carla et al., 2005).

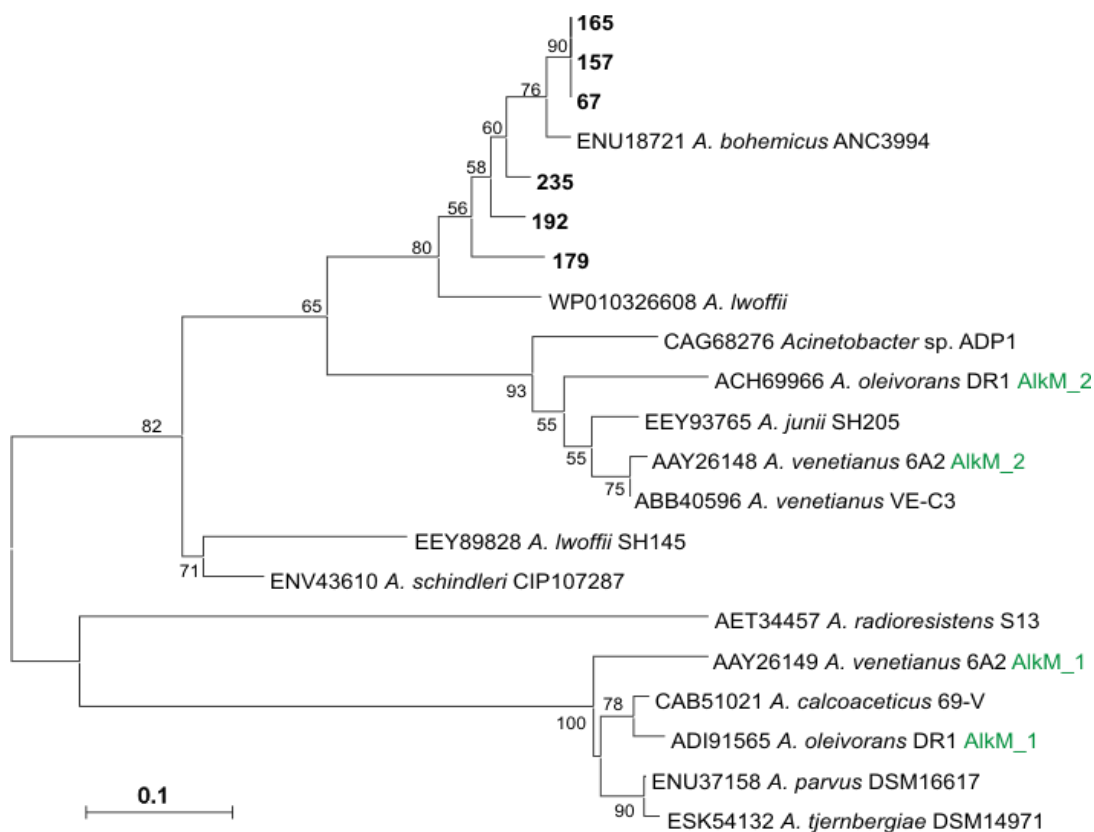
16S rRNA geeni fülogeneetilise analüüsi põhjal *Dietzia maris* liiki määratud bakteritüvel 35 (identsus 99%) tuvastatud AlkB järjestus oli 85% ulatuses identne *Dietzia* sp. AlkB järjestusga (Lisa 7; Joonis 10). Kuigi käesolevas töös uuritud tüve kasv testitud substraatidel ei olnud võrreldes kasvuga minimaaltassil väga tugev (Lisa 4A), on kirjanduse andmetel perekonna *Dietzia* esindajad head alkaanide lagundajad (Bihari et al. 2011; Weiwei et al. 2017). Alonso-Gutierrez'e töörühm näitas, et peale õlireostust domineeris proovis *Dietzia* sp. tüvi H0B, kes lagundas alifaatseid ja ka hargnenud ahelaga alkaane (ahela pikkusega C12-C38). Lisaks tuvastasid nad, et heksadekaanil kasvades tekkis vaheproduktina 8-heksadekeen, mis viitas uudsele alkaanide degradeerimise rajale. Nad märkisid, et perekond *Dietzia* alkaanide lagundamisvõimet tasub kindlasti edaspidi uurida, sest saadud tulemused viitasid uutele potentsiaalsete lagundamisradade olemasolule. (Alonso-Gutiérrez et al. 2011)

Töös isoleeritud bakteritüvi 107, kes 16S rRNA geeni fülogeneetilise analüüsi alusel määrati liiki *Mycobacterium setense* (Lisa 4; Joonis 10), omas perekonna *Mycobacterium* sp. AlkB järjestusega 96% identset AlkB järjestust (Lisa 7). Sarnaselt eelpool kirjeldatud tüvega ei olnud ka selle uuritud tüve kasv testitud substraatidel võrreldes kasvuga minimaaltassil eriti tugev, kõige parem kasv oli heksadekaanil (Lisa 4A, Joonis 11). Kirjanduse andmetel peetakse perekonna *Mycobacterium* esindajaid headeks aromaatsete ühendite lagundajateks. Mitmetel *Mycobacterium* liikidel on väga lai substraadispetsiifika, tänu millele on neid kasutatud bioaugmentatsioonil (Bottger et al., 1997; Hennessee ja Li, 2016; McLellan et al., 2002; Das, et al., 2015; Kim et al., 2010).

Tüvi 29 oli 16S rRNA geeni analüüsi põhjal kõige lähedasem (97% identsust) liigile *Williamsia limnetica* (Lisa 4A, Joonis 10). Nimetatud tüvi andis väga hea kasvujälje heksadekaani aurudes. *Williamsia limnetica* on hiljuti avastatud ja kirjeldatud bakteriliik, kes isoleeriti Izniki järve sedimendist Türgis (Sazak ja Sahin, 2012). Kuna tegemist on uue liigiga, puuduvad kirjanduses andmed nimetatud bakteriliigi naftasaaduste lagundamise võimest. Perekonda *Williamsia* kirjeldati esmakordselt 1999.aastal (Kämpfer et al., 1999). Seetõttu pole ka teiste perekonna esindajate kohta eriti palju andmeid aromaatsete ja alifaatsete ühendite lagundamisest. Mõned uuringud siiski näitavad, et *Williamsia* perekonna esindajaid leidub õliga saastunud aladel ja nad suudavad süsivesinikke kasutada energiaallikana (Obuekwe et al., 2009; Giebler et al., 2013).



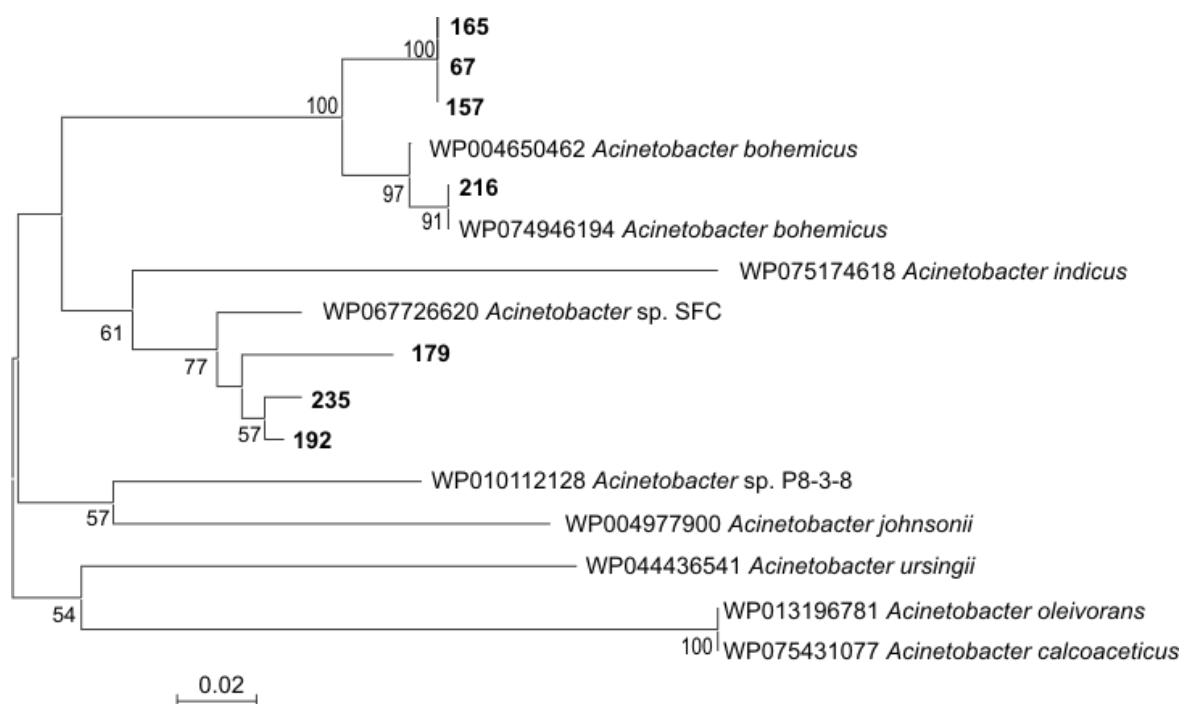
Käesolevas uurimistöös isoleeriti seitse (192, 235, 216, 157, 67, 165 ja 179) heksadekaanil kasvavat *Acinetobacter* perekonda kuuluvat tüve (Lisa 4B). Kuigi tegemist on hõimkonda *Gammaproteobacteria* kuuluva perekonnaga on nende membraaniseoselise alkaani hüdroksülaasi (tähistatakse AlkM) kodeerivate geenide järjestused nii palju erinevad, et eelnevalt nimetatud universaalsete AlkB praimeritega antud tüvede korral produkti ei õnnestunud amplifitseerida. Seepärast kasutati *Acinetobacteria* perekonda kuuluvate tüvede korral kirjanduses ilmunud AlkM praimereid (Tabel 1). Lisaks testiti tüvedel AlmA praimeritega (Tabel 1) tsütoplasmaatilise flaviinseoselise Baeyer-Villiger tüüpi monooksügenaasi olemasolu, mis osalevad pikkade alkaanide (C20-C36) lagundamisel (Throne-Holst *et al.*, 2006). Kuuel tüvel (157, 67, 165, 192, 179 ja 235) seitsmest detekteeriti alkM geeni olemasolu (Lisa 8; Joonis 12).



Joonis 12. *Acinetobacter* tüvede ennustatavate AlkM aminohappeliste järjestuste (94 ah) põhjal koostatud fülogeneetiline puu. GenBank andmebaasist võetud järjestuste puhul on toodud bakteri GenBank ID number ning vastava bakteri nimi (mitut AlkM järjestust omavad tüved on tähistatud rohelise värviga). Fülogeneetiline puu on koostatud lähinaabrite ühendamise meetodil. Bootstrap väärtused on märgitud alates 50%. Mõõtkava vastab 0,1 aminohappe asendusele ühe aminohappe kohta.

Nendest kolm tüve (192, 165, 179) andsid hea kasvujälje heksadekaani aurudes (Lisa 4B). Samas kõigil seitsmel isoleeritud tüvel tuvastati *almA* geen (Joonis 13; Lisa 8). Wang ja Shao

uurisid *almA* geeni mitmekesisust nii merebakterite kui ka õliga reostunud kooslustes ning näitasid selle suurt esinemissagedust süsivesinikke lagundavates bakterites. Oletati, et nimetatud geenil on oluline roll pika ahelaga alkaanide lagundamisel merekeskkonnas (Wang ja Shao, 2012).



Joonis 13. *Acinetobacter* tüvede ennustatavate AlmaA aminohappeliste järjestuste (209-210 ah) põhjal koostatud fülogeneetiline puu. GenBank andmebaasist võetud järjestuste puhul on toodud bakteri nimi ning vastav GenBank ID number. Fülogeneetiline puu on koostatud lähinaabrite ühendamise meetodil. Bootstrap väärtused on märgitud alates 50%. Mõõtkava vastab 0,02 aminohappe asendusele ühe aminohappe kohta.

Käesolevas töös kasutatud *almA* geenifragmendi tuvastamiseks kasutatud praimeride paar oli disainitud ainult perekonna *Acinetobacter* vastavaid järjestusi kasutades. Seetõttu ei anna antud töös saadud tulemused terviklikku pilti pikkade alkaanide lagundamisel olulise AlmaA mitmekesisusest Läänemere mikroobikooslustes.

Perekonna *Acinetobacter* liikide vastu tuntakse suurt huvi tänu nende laiale substraadi spetsiifikale ja headele tulemustele erinevates keskkonnas ja biotehnoloogilistes rakendustes (Abdel-El-Haleem, 2003; Applegate *et al.*, 1998; Hay *et al.*, 2000). Hiinas läbiviidud uurimistöös näidati, et mõned *Acinetobacter* tüved võivad kasvada fenooli ja heksadekaani segul, kusjuures eelistatud substraadiks oli fenool. Heksadekaani juuresolekul fenooli

lagundamise efektiivsus tõusis, kuid fenooli manulus pärsis heksadekaani lagundamist (Sun *et al.*, 2012). Osad käesolevas töös perekonda *Acinetobacter* kuuluvad isolaadid on samuti võimelised kasvama nii heksadekaanil kui ka fenoolil. Seega oleks huvitav uurida, kuidas toimub nende kahe substraadi segu lagundamine Läänemerest isoleeritud perekonda *Acinetobacter* kuuluvates tüvedes.

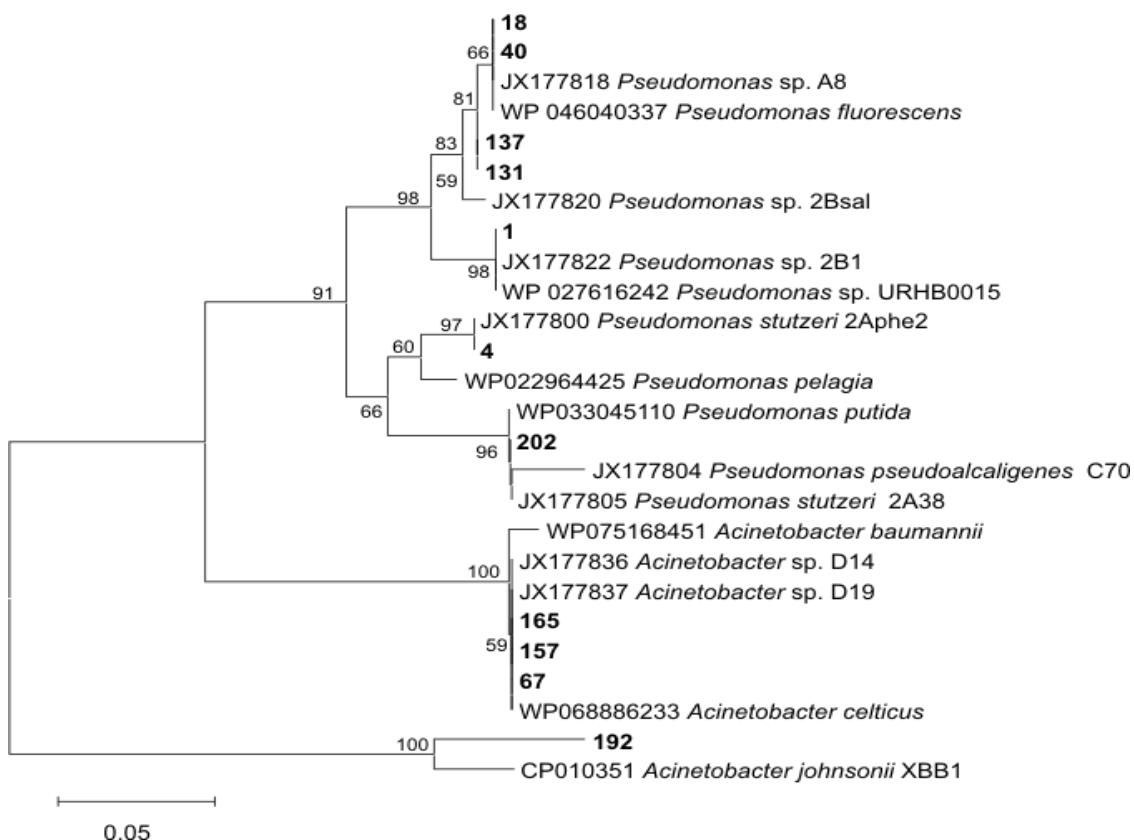
Saadud tulemused näitasid, et Läänemere mikroobide alkaani hüdroksülaaside järjestused on mitmekesised ning paljude isoleeritud tüvede kasv alkaanidel on hea. Sellest lähtuvalt võib arvata, et Läänemere bakterikooslusel on hea kataboolne potentsiaal alkaanide lagundamiseks.

### 2.3.5 Aromaatsete ühendite lagundamisel osalevate võtmeensüümide tuvastamine

Ühe- ja multikomponendilised fenooli hüdroksülaasid katalüüsivad fenooli lagundamist katehhoolluks (Dagley ja Gibson, 1965). Looduses on levinumad multikomponentsed fenooli hüdroksülaasid (mPH) ning neid on kirjeldatud erinevatel bakteriperekondadel (Hermann *et al.*, 1995; Bertoni *et al.*, 1996; Cafaro *et al.*, 2004). Fenooli lagundamisel tekkinud katehhoollagundatakse kas katehhooli 1,2- (C12O) või 2,3-diokügenaasi (C23O) poolt (Harayama *et al.*, 1992).

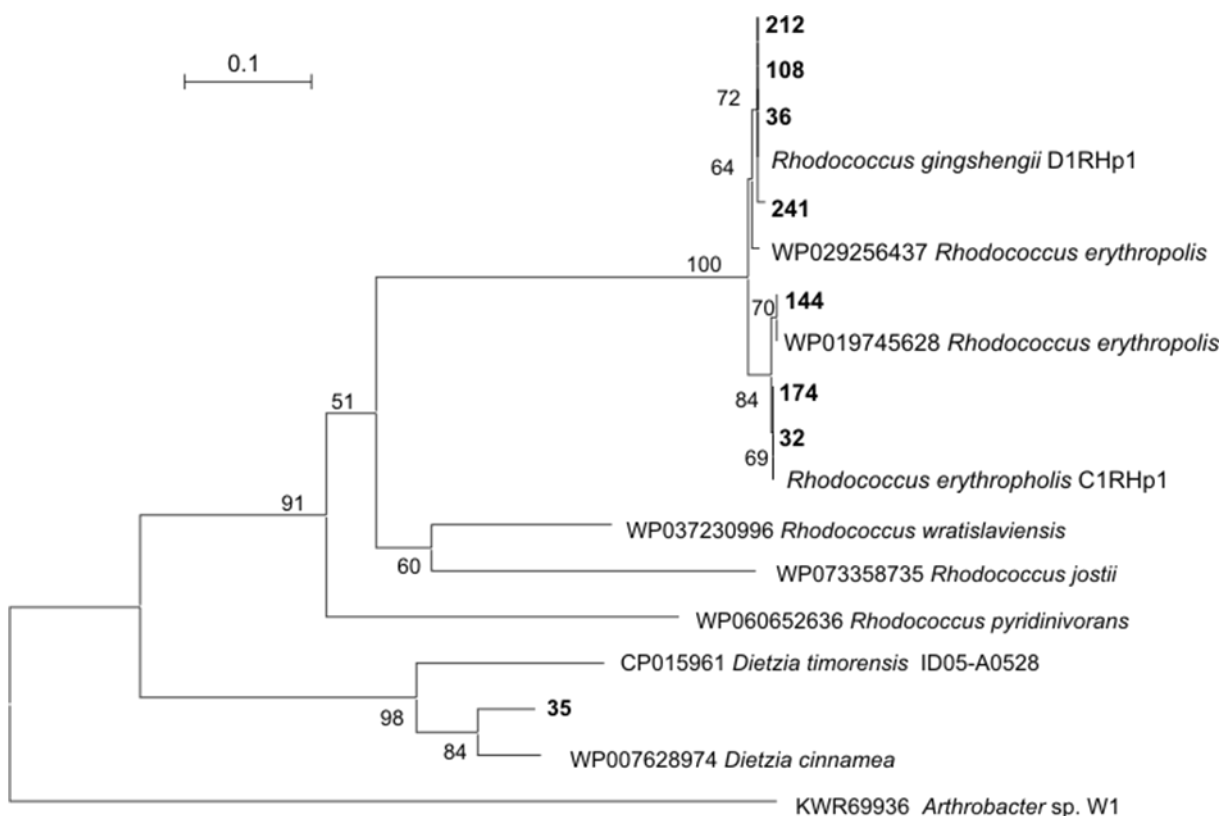
Käesolevas uurimistöös tuvastati LmPH (Large subunit of Multicomponent Phenol Hydroxylase) geeni esinemine 17 tüvel (Lisa 6, 7 ja 8) perekondadest *Pseudomonas* (7), *Acinetobacter* (4) ja *Rhodococcus* (6), kes kõik kasvasid väga hästi fenooli ning mitmed tüved ka naatriumsalitsülaadi minimaaltassidel (Lisa 4A ja 4B).

LmPH fülogeneetilisel puul moodustasid eraldi klasteri perekonda *Acinetobacter* kuuluvad tüved 157, 67, 165 ja 192 (Joonis 14, Lisa 8) ning katehhooli lagundamine toimus neis ensüümi C12O abil.



Joonis 14. Tüvede ennustatavate LmPH ennustatavate aminohappeliste järjestuste (173 ah) põhjal lähinaabrite ühendamise meetodil koostatud fülogeneetiline puu. GenBank andmebaasist võetud järjestuste puhul on toodud bakteri nimi ning vastav GenBank ID number. Bootstrap väärtused on märgitud alates 50%. Mõõtkava vastab 0,05 ah asendusele ühe ah kohta.

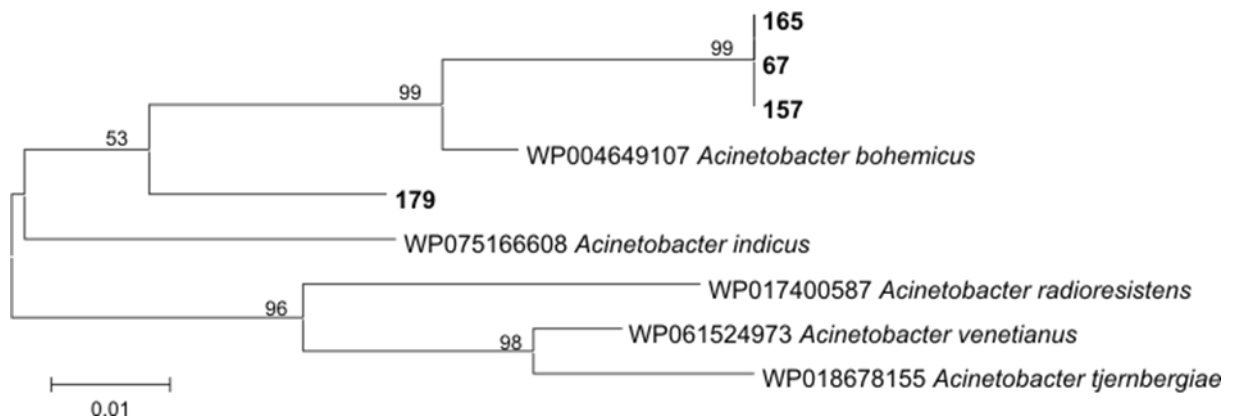
Kõik nimetatud tüved kasvasid hästi fenoolil ning tüvi 192 (Lisa 4B), kelle LmPH järjestus erines kõige rohkem teiste omast, ka salitsülaadil. Perekonna *Acinetobacter* erinevaid liike peetakse olulisteks liikmeteks mulla mikroobikoosluses, sest osalevad aromaatsete ühendite lagundamisel ning neid on võimalik kasutada ka saastunud pinnase bioaugmentatsioonil (Yu *et al.* 2005).



Joonis 15. Isoleeritud Gram-postiivsete tüvede C12O ennustatavate aminohappeliste järjestuste (187 ah) põhjal lähinaabrite ühendamise meetodil koostatud fülogeneetiline puu. GenBank andmebaasist võetud järjestuste puhul on toodud bakteri nimi ning vastav GenBank ID number. Bootstrap väärtused on märgitud alates 50%. Mõõtkava vastab 0,1 aminohappe asendusele ühe aminohappe kohta.

Fenoolil kasvanud pseudomonaadidel 18, 40, 137, 131, 1, 4, 202 tuvastatud LmPH järjestused moodustasid fülogeneetilisel puul eraldi klatri (Joonis 14, Lisa 6), mille sees on omakorda toimunud rühmitumine. Pseudomonaadidel on kirjeldatud katehooli lagundamist nii C12O kui ka C23O abil. Kõigil uuritud tüvedel testiti C23O olemasolu tassil kasvanud biomassi pritsimisega katehooli lahusega (positiivse raktsiooni korral värvus biomass kollaseks) kui ka C23O kodeerivate geenide amplifitseerimisega. PCR-ga tuvastati C23O olemasolu kokku kaheksal tüvel (Lisa 6). Nendest kuus tüve (201, 92, 180, 234, 202, 4) kuulusid perekonda *Pseudomonas* ja kaks tüve (16, 26) perekonda *Sphingobium* (Lisa 6), kusjuures tüved 201 ja 26 omavad kahte erinevat C23O järjestust. Katehooliga pritsides saadi positiivne tulemus

veel tüvedega 167, 148, 38, kuid mitte PCR meetodit kasutades. Uuritavade tüvede hulgas moodustus kolm rühma: LmPH+/C23O+ (202, 4), LmPH+/C23O- (18, 40, 137, 131, 1) ja LmPH-/C23O+ (201, 92, 180, 234, 16, 26). Kahte viimasesse rühma kuuluvad tüved kasvasid hästi fenooli ja/või toluenil, mistõttu võivad nad kasutada täiesti erinevaid lagundamisradasid ning vajavad edasist uurimist.

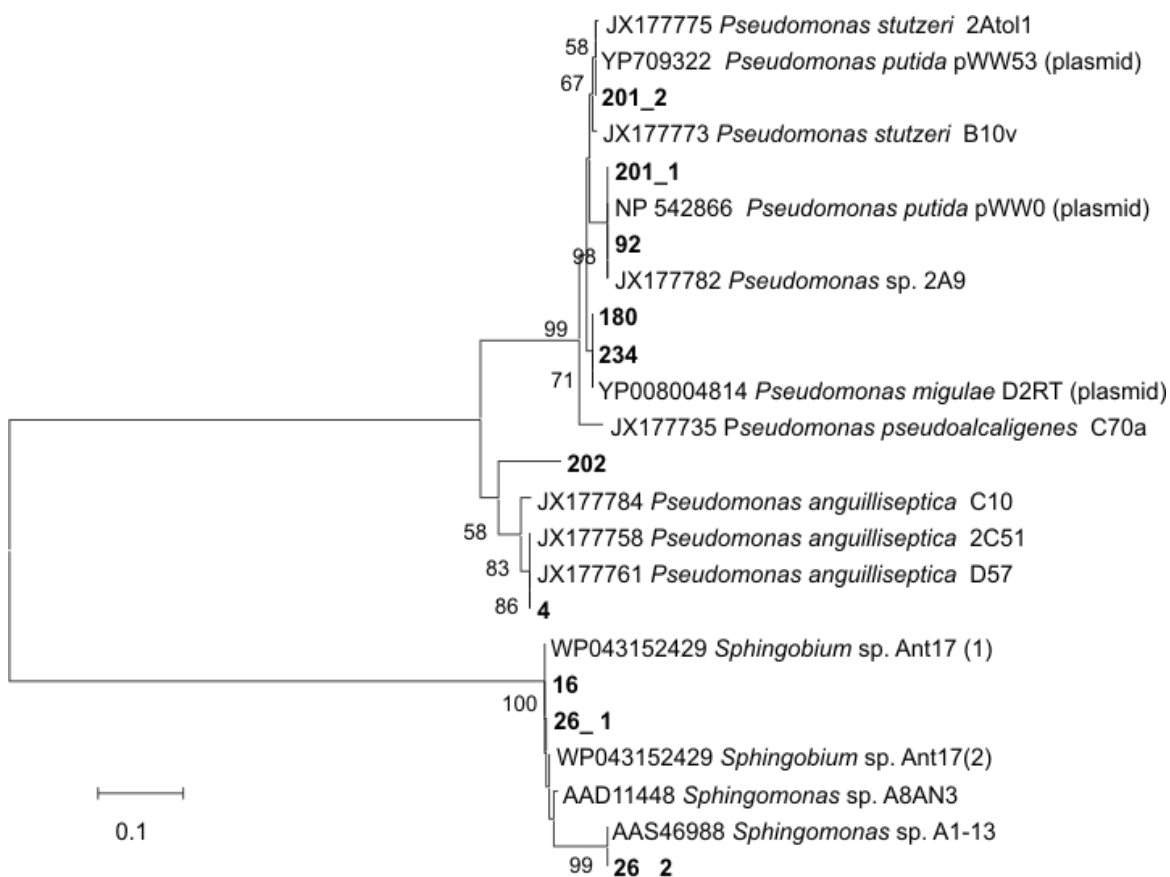


Joonis 16. *Acinetobacter* tüvede C12O ennustatavate aminohappeliste järjestuste (151 ah) lähinaabrite ühendamise meetodil koostatud fülogeneetiline puu. GenBank andmebaasist võetud järjestuste puhul on toodud bakteri nimi ning vastav GenBank ID number. Bootstrap väärtused on märgitud alates 50%. Mõõtkava vastab 0,01 aminohappe asendusele ühe aminohappe kohta.

*Pseudomonas* sp. tüvi 202 LmPH järjestus klasterdus fülogeneetilisel puul (Joonis 14) lähestikku *P. pseudoalcaligenes* tüve C70 (eraldatud Läänemere suvistest proovidest, Vedler *et al.*, 2013) järjestusega ning mõlemad tüved omasid kahte erinevat C23O järjestust. Kuid erinevalt tüvest C70 (Jõesaar *et al.* 2017), ei leitud tüvel 202 võimet kasvada salitsülaadil. Kirjanduses on näidatud, et kahe või enama katehhooli dioksügenaasi omamine aitab bakteris hoida rakusisese katehhooli kontsentratsiooni madalana ning hoiab ära ühendi toksilisuse mõju organismile (Jimenez *et al.*, 2014; Jõesaar *et al.*, 2017). Klasterdumist samasse klastrisse suvistest proovidest isoleeritud tüvedega on näha ka tüvede 4 ja 2Aphe2, 1 ja 2B1 ning 18, 40, 137, 131 ja A8 puhul (Joonis 14), seejuures kattuvad ka loetletud tüvede C23O andmed.

*Rhodococcus* perekonda kuuluvatel isolaatidel tuvastati LmPH kodeeriv geen kuuel (36, 108, 212, 24, 32, 174) tüvel (Lisa 7), kelle kasv fenooli sisaldaval minimaaltassil oli väga hea. LmPH aminohappelised järjestused olid omavahel identsed ning kõige lähedasemad bakteri *R. erythropolis* fenooli hüdroksülaasi järjestustele. Katehhooli lagundmine toimub *Rhodococcus* perekonna erinevates tüvedes mööda katehhooli *ortho*-rada (Joonis 1). Gram-positiivsete

bakterite perekondadest pärinevatel isolaatidel detekteeriti LmPH olemasolu veel *Arthobacter* sp. tüvel 2 (Lisa 7). Samuti fenoolil kasvanud *Dietzia* sp. tüvel 35 detekteeriti C12O, kuid kahjuks mitte LmPH (Joonis 15; Lisa 7).



Joonis 17. Isoleeritud tüvede C23O ennustatavate aminohappeliste järjestuste (245 ah) lähinaabrite ühendamise meetodil koostatud fülogeneetiline puu. GenBank andmebaasist võetud järjestuste puhul on toodud bakteri nimi ning vastav GenBank ID number. Bootstrap väärtused on märgitud alates 50%. Mõõtkava vastab 0,1 aminohappe asendusele ühe aminohappe kohta.

Jutkina *et al.* 2011 näitasid, et Läänemere pinnaveest eraldatud tüvedest 29% omab ühte või enamat plasmidi, mis tõenäoliselt võivad kanda ka mitmesuguseid kataboolseid geene. Seetõttu võiks ka käesolevas töös isoleeritud tüvedel määrata plasmiidide olemasolu ning struktuuri.

Naatriumsalitsülaadi, polüaromaatsete ühendite lagundamisel tekkiv vaheühend, kasutamist isolaatide poolt küll testiti (Lisa 4A, 4B, 5A, 5B), kuid vastavate kataboolsete geenide tuvastamiseni käesolevas töös ei jõutud.

# KOKKUVÕTE

Läänemeri on suuruselt teine riimveeline veekogu maailmas, kus elavad koos nii mere-, mage-, kui ka riimvee organismid. Kahjuks peetakse Läänemerd üheks enam saastatumaks mereks maailmas. Tihe laevaliiklus ning aktiivne inimtegevus merel ja rannikul tõstavad naftalekete ja suurõnnetuste toimumise tõenäosust mitmekordselt. Bakteritel on tähtis roll inimeste poolt merekeskkonda paisatud ohtlike kemikaalide lagundamisel. Tundes nende koosluste struktuuri ja reaktsiooni erinevatele tingimustele, aitab see meil paremini mõista ja hinnata, kuidas erinevad faktorid mõjutavad Läänemere ökosüsteemi funktsiooni ja tasakaalu.

Käesoleva bakalaureusetöö põhieesmärgiks oli hinnata Läänemere pinnavee ja setete mikroobikoosluste kataboolset potentsiaali erinevate naftast pärinevate süsivesinike lagundamisel külmal perioodil. Samuti sooviti välja tuua geneetilised tegurid, mis vastutavad aromaatsete ja alifaatsete ühendite katabolismi eest. Viimaseks eesmärgiks oli isoleerida ja iseloomustada mikroobitüvesid, keda oleks võimalik kasutada bioaugmentatsioonil õlireostuse likvideerimiseks. Antud töös saadud tulemused võib kokku võtta järgnevalt:

1. vee soolsusel, temperatuuril ja naftasaaduste kontsentratsioonil on oluline mõju mikroobikoosluste koostisele;
2. toornafta lisamise tagajärjel vähenes bakterikoosluste mitmekesisus võrreldes algsete veeproovide mitmekesisusega;
3. tüvede 16S rRNA geeni fülogeneetilise analüüsi alusel domineerisid talvisel perioodil isoleeritud tüvede hulgas hõimkonnad *Proteobacteria* ja *Actinobacteria*;
4. naftasaadusi lagundavaid kataboolseid geene (*alkB*, *alkM*, *almA*, *LmPH*, *C12O*, *C23O*) tuvastati perekondadel *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacteria*, *Sphingomonas*, *Dietzia*, *Mycobacterium*, *Williamsia*, *Arthrobacter* ja *Aeromicrobium*;
5. perekonda *Rhodococcus* kuuluvatel tüvedel leiti 3-5 järjestuselt erinevat homoloogset *alkB* geeni;

Käesoleva bakalaureusetöö tulemused näitavad, et Läänemerest isoleeritud bakteritüvede kataboolsed geenid on mitmekesised ning tüved suudavad lagundada erinevaid naftast pärinevaid ühendeid. Seega võib järeldada, et Läänemere mikroobikooslustel on hea kataboolne potentsiaal naftasaaduste lagundamiseks.



## **Biodiversity of the Baltic Sea surface water and sediment bacteria during the cold period: catabolic potential of degradation of oil products**

Kevin Liivapuu

### **Summary**

The brackish Baltic Sea water is under permanent oil pollution pressure due to heavy ship traffic that leads to high risk for oil pollution. Bacteria are key players in biodegradation of the oil derived petroleum hydrocarbons in oil-polluted environments. Despite to the sensitive and unique nature of the Baltic Sea, only very few studies dealing with the biodegradation potential of oil components by microbial communities are available. Moreover, there is no data concerning the activity of biodegradative bacterial communities at the winter time.

The main aim of this study was to characterize the biodegradative microbial communities of the sediment and surface water samples of the Baltic Sea taken at winter time. The genetic factors responsible for the catabolism of aromatic and aliphatic compounds were also sought. The final goal was to isolate and characterize microbial strains that could be used in bioremediation experiments. The results of the study can be summarized as follows:

1. salinity, temperature and concentration of oil products have a significant influence on the composition of microbial communities;
2. addition of crude oil to the microcosms reduced the diversity of bacterial communities compared with the diversity of the original water samples;
3. analysis of 16S rRNA gene sequences showed that the phyla *Proteobacteria* and *Actinobacteria* are dominant in the cold period;
4. catabolic genes (*alkB*, *alkM*, *almA*, LmPH, C12O, C23O) responsible for degradation of oil products were identified in the genera *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacteria*, *Sphingomonas*, *Dietzia*, *Mycobacterium*, *Williamsia*, *Arthrobacter* and *Aeromicrobium*;
5. almost all strains from the genus *Rhodococcus* had multiple *alkB* genes.

The results of this study show that the catabolic genes isolated from the Baltic Sea bacterial strains are diverse and capable of degrading various compounds from crude oil. Thus, it can be concluded that the Baltic Sea microbial community has a good catabolic potential for the degradation of oil pollution.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Abdel-El-Haleem, D.** (2003). Acinetobacter: environmental and biotechnological applications. *Afr. J. Biotechnol.* 2: 71-75.
- Adams, M. H.** (1959). Bacteriophages, p. 445-447. In Interscience Publishers Inc, New York.
- Adbel-Shafy, H. I., Mansour, M. S. M.** (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* 25: 107-123.
- Ahn, E., Young, K., Beom, C., Kang, S., Zylstra, G. J., Kim, D., Kim, E.** (2017). Salicylate degradation by a cold-adapted *Pseudomonas* sp. *Ann. Microbiol.* 67: 417-424.
- Alonso-Gutiérrez, J., Teramoto, M., Yamazoe, A., Harayama, S., Figueras, A., Novoa, B.** (2011). Alkane-degrading properties of *Dietzia* sp. H0B, a key player in the Prestige oil spill biodegradation (NW Spain). *J. Appl. Microbiol.* 111: 800-810.
- Alvarez, V. M., Korenblum, E., Seldin, L.** (2011). Comparative bioremediation of crude-oil amended tropical soil microcosms by natural attenuation, bioaugmentation or bio-enrichment. *Appl. Environ. Soil Sci.* 2011: 1-10.
- An, H. R., Park, H. J., Kim, E. S.** (2001). Cloning and expression of thermophilic catechol 1,2-dioxygenase gene (*catA*) from *Streptomyces setonii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 195: 17–22.
- Applegate, B. M., Kehrmeier, S. R., Sayler, G. S.** (1998). A chromosomally based *tod-luxCDABE* whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) sensing. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2730-2735.
- Ayala, M., Torres, E.** (2004). Enzymatic activation of alkanes: constraints and prospective. *Appl. Catal. J.* 272: 1–13.
- Baelum, J., Borglin, S., Chakraborty, R., ... Jansson, J. K.** (2012). Deep sea bacteria enriched by oil and dispersant from the Deepwater Horizon spill. *Environ. Microbiol.* 14: 2405-2416.
- Bauchop, T., Eldsen, S. R.** (1960). The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. *J. Gen. Microbiol.* 23: 457-469.
- Bertoni, G., Bolognesi, F., Galli, E., Barbieri, P.** (1996). Cloning of the genes for and characterization of the early stages of toluene catabolism in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3704–3711.
- Bihari Z., Szvetnik A., Szabó Z., Blastyák A., Zombori Z., Balázs M., Kiss I.** (2011). Functional analysis of long-chain n-alkane degradation by *Dietzia* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 316: 100-107.
- Binazadeh, M., Karimi, A. I. Li, Z.** (2009). Fast biodegradation of long chain n-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus* sp. Moj-3449. *Enzyme. Microbial. Technol.* 45: 195-202.
- Bosch, R., Moore, E. R. B., García-Valdés, E., Pieper, D. H.** (1999). NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. *J. Bacteriol.* 181: 2315-2322.

- Bottger, E. C., Kirschner, P., Springer, B., Zumft, W.** (1997). *Mycobacteria* degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 247.
- Bouvier, T. C., del Giorgio, P. A.** (2002). Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnol. Oceanogr.* 47: 333-612.
- Broderick, J. B.** (1999). Catechol dioxygenases. *Essays in Biochem.* 34: 173-189.
- Brooijmans, R. J. W., Pastink, M. I., Siezen, R. J.** (2009). Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. *Microb. Biotechnol.* 2: 587-594.
- Brunila, O. P., StorgArd, J.** (2014). Changes in oil transportation in the years 2020 and 2030 – the case of the Gulf of Finland. *Int. J. Marine Nav. Safety of Sea Transport.* 8: 403-409.
- Cafaro, V., Izzo, V., Scognamiglio, R., Notomista, E., Capasso, P., Casbarra, A., Pucci, P., Donato, A. D.** (2004). Phenol hydroxylase and toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: interplay between two enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2211-2219.
- Cappelletti, M., Fedi, S., Frascari, D., Ohtake, H., Turner, R. J., Zannoni, D.** (2011). Analyses of both the *alkB* gene transcriptional start site and *alkB* promoter-inducing properties of *Rhodococcus* sp. strain BCP1 grown on n-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 1619-1627.
- Carla, C. C., de Carvalho, R., Manuela, M., ds Fonseca R.** (2005). Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51: 389-399.
- Chakrabarty, A. M.** (1972). Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 112: 815-823.
- Chikere, C. B., Okpokwasiliand, G. C., Chikere, B. O.** (2009). Bacterial diversity in a tropical crude oil polluted soil undergoing bioremediation. *Afr. J. Biotechnol.* 8: 2535-2540.
- Christiane T., Hennessee, X., Li, X.** (2016). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures on degradation, gene expression, and metabolite production in four *Mycobacterium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 82: 3357-3369.
- Chua, C. H., Feng, Y., Yeo, C. C., Khoo, H. E., Poh, C. L.** (2001). Identification of amino acid residues essential for catalytic activity of gentisate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 141-146.
- Civilini, M., Bertoldi, M. D. E., Tell, G.** (1999). Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* 2NR degrading naphthalene. *Appl. Microbiol.* 29: 181-186.
- Cordova-Rosa, S. M., Dams, R. I., Cordova-Rosa, E. V., Radetski, M. R., Corrêa, A. X., Radetski, C. M.** (2009). Remediation of phenol-contaminated soil by a bacterial consortium and *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from an industrial wastewater treatment plant. *J. Hazard. Mater.* 164: 61-66.
- Coulon, F., McKew, B. A., Osborn, A. M., McGenity, T. J., Timmis, K. N.** (2007). Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environ. Microbiol.* 9: 177-186.
- Dagley, S., Gibson, D. T.** (1965). The bacterial degradation of catechol. *Biochem. J.* 95: 466-474.

- Das, S., Pettersson, B. M., Behra, P. R., Ramesh, M., Dasgupta S., Bhattacharya, A., Kirsebom, L. A.** (2015). Characterization of three *Mycobacterium* spp. with potential use in bioremediation by genome sequencing and comparative genomics. *Genome. Biol. Evol.* 7: 1871-86.
- de Lima-Morales, D., Chaves-Moreno, D., Wos-Oxley, M. L., Jáuregui, R., Vilchez-Vargas, R., Pieper, D. H.** (2016). Degradation of benzene by *Pseudomonas veronii* 1YdBTEX2 and 1YB2 is catalyzed by enzymes encoded in distinct catabolism gene clusters. *Appl. Environ. Microbiol.* 82: 167-173.
- Edlund, A., Hårdeman, F., Jansson, J. K., Sjöling, S.** (2008). Active bacterial community structure along vertical redox gradients in Baltic Sea sediment. *Environ. Microbiol.* 10: 2051-2063.
- Eriksson, M., Ka, J. O., Mohn, W. W.** (2001). Effects of low temperature and freeze-thaw cycles on hydrocarbon biodegradation in Arctic tundra soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5107-5112.
- Fuenmayor, S. L., Wild, M., Boyes, A. L., Williams, P. A.** (1998). A Gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. *J. Bacteriol.* 180: 2522-2530.
- Futamata, H., Harayama, S., Watanabe, K.** (2001). Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4671-4677.
- Garnaga, G.** (2012). Integrated assessment of pollution in the Baltic Sea. *Ekologija* 58: 331-355.
- Giebler, J., Wick, L. J., Chatzinotas, C. A., Harms, H.** (2013). Alkane-degrading bacteria at the soil–litter interface: comparing isolates with T-RFLP-based community profiles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86: 45–58.
- Grund, E., Knorr, C., Eichenlaub, R.** (1990). Catabolism of benzoate and monohydroxylated benzoates by *Amycolatopsis* and *Streptomyces* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1459-1464.
- Hall, T. A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hamamura, N., Fukui, M., Ward, D. M., Inskeep, W. P.** (2008). Assessing soil microbial populations responding to crude-oil amendment at different temperatures using phylogenetic, functional gene (*alkB*) and physiological analyses. *Environ. Sci. Technol.* 42: 7580-7586.
- Harayama S., Kok, M., Neidle E. L.** (1992). Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 565-601.
- Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., Shutsubo, K.** (1999). Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 63-70.
- Harayama, S., Rekik, M.** (1989). Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J. Biol.Chem.* 264: 15328-15333.
- Harpel, M. R., Lipscomb, J. D.** (1990). Gentisate 1,2-dioxygenase from pseudomonas. Purification, characterization, and comparison of the enzymes from *Pseudomonas testosteroni* and *Pseudomonas acidovorans*. *J. Biol. Chem.* 265: 6301-6311.

- Harwood, C. S., Parales, R. E.** (1996). The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 553-590.
- Hay, A. G., Applegate, B. M., Bright, N. G., Sayler, G. S.** (2000). A bioluminescent whole-cell reporter for detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenol in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4589- 4594.
- Head, I. M., Jones, D. M., Roling, W. F. M.** (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 173-182.
- HELCOM.** (2018). HELCOM Annual report on discharges observed during aerial surveillance in the Baltic Sea, 2017.
- Hennessee, C. T., Li, Q. X.** (2016). Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Mixtures on Degradation, Gene Expression, and Metabolite Production in Four Mycobacterium Species. *Appl. Environ. Microbiol.* 82:3357-3369.
- Herlemann, D. P. R., Lundin, D., Andersson, A. F., Labrenz, M., Jürgens, K.** (2016). Phylogenetic signals of salinity and season in bacterial community composition across the salinity gradient of the Baltic Sea. *Front. Microbiol.* 7: 1883.
- Herlemann, D. P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Wanick, J. J., Andersson, A. F.** (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 5: 1571-1579.
- Herrmann, H., Müller, C., Schmidt, I., Mahnke, J., Petruschka, L., Hahnke, K.** (1995). Localization and organization of phenol degradation genes of *Pseudomonas putida* strain H. *Mol. Genet. Genomics.* 24: 240–246.
- Jimenez, J. I., Perez-Pantoja, D., Chavarria, M., Diaz, E., de Lorenzo V. A.** (2014). Second chromosomal copy of the *catA* gene endows *Pseudomonas putida* mt-2 with an enzymatic safety valve for excess of catechol. *Environ. Microbiol.* 16: 1767–1778.
- Junca, H., Pieper, D. H.** (2004) Functional gene diversity analysis in BTEX contaminated soils by means of PCR-SSCP DNA fingerprinting: comparative diversity assessment against bacterial isolates and PCR-DNA clone libraries. *Environ. Microbiol.* 6: 95–110.
- Jutkina, J., Heinaru, E., Vedler, E., Juhanson, J., Heinaru, A.** (2011). Occurrence of plasmids in the aromatic degrading bacterioplankton of the Baltic Sea. *Genes* 2: 853–868.
- Jõesaar, M., Viggor, S., Heinaru, E., Naanuri, E., Mehike, M., Leito, I., Heinaru, A.** (2017). Strategy of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 for effective degradation of phenol and salicylate. *PLoS ONE*, 12: 1-17.
- Kaldma, A.** (2007). Merereostustõrje käsiraamat. p. 5-11. SA Eestimaa Looduse Fond, Tartu.
- Kim, S. J., Kweon, C. E., Cerniglia, E.** (2010). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Mycobacterium* strains. p. 1865-1879. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*
- Koskinen, K., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P., Kankaanpää, H.** (2011). Spatially different bacterial communities in water columns of the northern Baltic Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75: 99-110.

- Kostianoy, A. G., Litovchenko, K., Lebedev, S. A., Stanichny, S., Soloviev, D., Pichuzhkina, O. E.** (2005). Operational satellite monitoring of oil spill pollution in the southeastern Baltic Sea. Conference: Oceans 2005 – Europe Volume: 1.
- Kämpfer, P. Andersson, M. A., Rainey, F. A., Kroppenstedt, R.M., Salkinoja-Salonen, M.** (1999). *Williamsia muralis* gen. nov., sp. nov., isolated from the indoor environment of a children's day care centre. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 681-687.
- Labinger, J. A., Bercaw, J. E.** (2002). Understanding and exploiting C–H bond activation. Nature. 417: 507–514.
- Lane, B. G.** (1991). Cellular desiccation and hydration: developmentally regulated proteins, and the muturation and germination of seed embryos. J. FASEB. 5: 2893-2901.
- Lenskaja, A.** (2014). Alkaani hüdroksülaasi (AlkB) mitmekesisus Läänemere bakterites. Bakalaureuse töö, Tartu Ülikool.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., de Bruijn, F. J.** (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2286-2295.
- Margesin, R., Labbé, D., Schinner, F., Greer, C. W., Whyte, L. G.** (2003). Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3085-3092.
- Marin, M. M., Yuste, L., Rojo, F.** (2003). Differential expression of the components of the two alkane hydroxylases from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 185: 3232-3237.
- McLellan, S. L., Warshawsky, D., Shann, J. R.** (2002). The effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on the degradation of benzo pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135. Environ. Toxicol. Chem. 21: 253-259.
- Mishra, V., Lal, R., Srinivasan.** (2001). Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 27: 133-166.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G.** (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700.
- Nair, D., Fernández-Acero, F. J., García-Luque, E., Riba, I., del Valls, T. A.** (2008). Isolation and characterization of naphthalene-degrading bacteria from sediments of Cadiz area (SW Spain). Environ. Toxicol. 23: 576-582.
- Nie, Y., Chi, C. Q., Fang, H., Liang, J. L., Lu, S. L., Lai, G. L., Tang, Y. Q., Wu, X. L.** (2014). Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. Sci. Rep. 4: 1-11.
- Obuekwe, O. C., Al-Jadi, Z. K., Al-Saleh, E. S.** (2009). Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. Int. Biodeter. Biodegr. 63: 273–279.
- Ogino, A., Koshikawa, H., Nakahara, T., Uchiyama, H.** (2001). Succession of microbial communities during a biostimulation process as evaluated by DGGE and clone library analyses. J. Appl. Microbiol. 91: 625-635.

- Ojaveer, H., Jaanus, A., Mackenzie, B. R., Martin, G., Olenin, S., Rasziejewska, T., Telesh, I., Zettler, M. L., Zaiko, A.** (2010). Status of biodiversity in the Baltic Sea. *PLoS ONE* 5: 1-19.
- Ornston, L. N., Stanier, R. Y.** (1966). The conversion of catechol and protocatechuate to beta-ketoadipate by *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* 241: 3776-3786.
- Paavola, M., Olenin, A., Leppäkoski, E.** (2005). Are invasive species most successful in habitats of low native species richness across European brackish water seas? *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 64: 738-750.
- Parales, R. E., Parales, J. V., Pelletier, D. A., Ditty, J. L.** (2008). Diversity of microbial toluene degradation pathways. *Adv. Appl. Microbiol.* 64: 1-73.
- Pawar, A. N., Ugale, S. S., More, M. G., Kokani, N. F., Khandelwal, S. R.** (2013). Biological degradation of naphthalene: a new era. *J. Bioremed. Biodeg.* 4: 1-5.
- Reunamo, A.** (2015). Bacterial community structure and petroleum hydrocarbon degradation in the Baltic Sea. p. 1-57. *ANNALES UNIVERSITATIS TURKUENSIS*. Painsalama Oy, Turku.
- Reunamo, A., Riemann, L., Leskinen, P., Jørgensen, K. S.** (2013). Dominant petroleum hydrocarbon-degrading bacteria in the Archipelago Sea in South-West Finland (Baltic Sea) belong to different taxonomic groups than hydrocarbon degraders in the oceans. *Mar. Pollut. Bull.* 72: 174-180.
- Reva, O. N., Hallin, P. F., Willenbrock, H., Sicheritz-Ponten, T., Tümmeler, B., Ussery, D. W.** (2008). Global features of the *Alcanivorax borkumensis* SK2 genome. *Environ. Microbiol.* 10: 613-625.
- Rheinheimer, G.** (1998). Pollution in the Baltic Sea. *Naturwissenschaften* 85: 318–329.
- Rieck, A., Herlemann, D. P. R., Jürgens, K., Grossart, H. P.** (2015). Particle-associated differ from free-living bacteria in surface waters of the Baltic Sea. *Front. Microbiol.* 6: 1-13.
- Riemann, L., Leitet, C., Pommier, T., Simu, K., Holmfeldt, K., Larsson, U., Hangström, Å.** (2008). The native bacterioplankton community in the central Baltic Sea is influenced by freshwater bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 503-515.
- Ruskule, A., Kuris, M., Leipute, G., Vetemaa, M., Zableckis, Š.** 2009. Läänemeri. Meie ühine kordumatu aare, p. 9-20.
- Röling, W. F., Milner, M. G., Jones, D. M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R. J., Head, I. M.** (2002). Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5537-5548.
- Sandhu, A., Halverson, L. J., Beattie, G. A.** (2009). Identification and genetic characterization of phenol-degrading bacteria from leaf microbial communities. *Microb. Ecol.* 57: 276–285.
- Sazak, A., Sahin, N.** (2012). *Williamsia limnetica* sp. nov., isolated from a limnetic lake sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 1414–1418.
- Sazonova, O. I., Yu, T., Izmalkova, I., Kosheleva, A., Boronin, A. M.** (2008). Salicylate degradation by *Pseudomonas putida* strains not involving the “Classical” nah2 operon. *Microbiol.* 77: 798-804.

- Schneiker, S., Martins dos Santos, V. A. P., Bartels, D., ... Golyshin, P. N.** (2006). Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nat. Biotech.* 24: 997-1004.
- Seo, J. S., Keum, Y. S., Li, Q. X.** (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 6: 278–309.
- Simu, K., Holmfeldt, K., Zweifel, U. L., Hagström, A.** (2005). Culturability and coexistence of colony-forming and single-cell marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4793-4800.
- Sjöqvist, C., Godhe, A., Sundqvist, L., Jonsson, P., Kremp, A.** (2015). Local adaptation and oceanographic connectivity patterns explain genetic differentiation of a marine diatom across the North Sea–Baltic Sea salinity gradient. *Mol. Ecol.* 24: 2871-2885.
- Smits, T. H. M., Balada, S. B., Witholt, B., van Beilen, J. B.** (2002). Functional analysis of alkane hydroxylases from gram-negative and gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 184: 1733-1742.
- Stauffer, E., Dolan, J. A., Newman, R.** (2008). Review of basic organic chemistry. *Fire Debris Analysis.* p. 49–83.
- Sueoka, K., Satoh, H., Onuki, M., Mino, T.** (2009) Microorganisms involved in anaerobic phenol degradation in the treatment of synthetic coke-oven wastewater detected by RNA stable-isotope probing. *FEMS Microbiol. Lett.* 291: 169-174.
- Sun, J. Q., Xu L., Tang Y. Q., Chen F. M., Wu X. L.** (2012). Simultaneous degradation of phenol and n-hexadecane by *Acinetobacter* strains. *Bioresour Technol.* 123: 664-668.
- Suzdalev, S., Gulbinskas, S., Sivkov, V., Bukanova, T.** (2014). Solutions for effective oil spill management in the south–eastern part of the Baltic Sea. *Baltica* 27: 3-8.
- Takei, D., Washio, K., Morikawa, M.** (2008). Identification of alkane hydroxylase genes in *Rhodococcus* sp. strain TMP2 that degrades a branched alkane. *Biotechnol. Lett.* 30: 1447-1452.
- Táncsics, A., Szoboszlay, S., Kriszt, B., Kukolya, J., Baka, E., Márialigeti, K., Révész, S.** (2008). Applicability of the functional gene catechol 1,2-dioxygenase as a biomarker in the detection of BTEX-degrading *Rhodococcus* species. *J. Appl. Microbiol.* 105: 1026-1033.
- Throne-Holst, M., Markussen, S., Winnberg, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Zotchev, S. B.** (2006). Utilization of n-alkanes by a newly isolated strain of *Acinetobacter venetianus*: the role of two AlkB-type alkane hydroxylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 353–360.
- Tiirik, K., Nõlvak, H., Oopkaup, K., Truu, M., Preem, J. K., Heinaru, A., Truu, J.** (2014). Characterization of the bacterioplankton community and its antibiotic resistance genes in the Baltic Sea. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 61: 23–32.
- Valle, A., Bailey, M. J., Whiteley, A. S., Manefield, M.** (2004). N-acyl-l-homoserine lactones (AHLs) affect microbial community composition and function in activated sludge. *Environ. Microbiol.* 6: 424-433.
- van Beilen, J. B., Funhoff, E. G.** (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 13–21.
- van Beilen, J. B., Li1, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H. M., Witholt, B.** (2003). Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil Gas Sci. Technol.* 58: 427-440.



- van Beilen, J. B., Smits, T. H. M., Whyte, L. G., Schorcht, S., Röthlisberger, M., Plaggemeier, T., Engesser, K. H., Witholt, B.** (2002). Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains. *Environ. Microbiol.* 4: 676-682.
- van Beilen, J. B., Wubbolts, M. G., Witholt, B.** (1994). Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation.* 5: 161-174.
- van der Meer, J. R.** (1997). Evolution of novel metabolic pathways for the degradation of chloroaromatic compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 71: 159-178.
- van der Meer, J. R.** (2002). Evolution of metabolic pathways for degradation of environmental pollutants. *Encyclopedia of Environmental Microbiology* p. 1194-1207.
- van der Meer, J. R., de Vos, W. M., Harayama, S., Zehnder, A. J.** (1992). Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56: 677-694.
- Vanhoenacker, G., David, F., Sandra, P.** (2015). Profiling of polycyclic aromatic hydrocarbons in crude oil with the agilent 1290 Infinity 2D-LC solution. p. 1-8. Agilent Technologies, Inc., Published in the USA.
- Vedler, E., Heinaru, E., Jutkina, J., Viggor, S., Koressaar, T., Remm, M., Heinaru, A.** (2013). *Limnobacter* spp. as newly detected phenol-degraders among Baltic Sea surface water bacteria characterised by comparative analysis of catabolic genes. *Syst. Appl. Microbiol.* 36: 525-532.
- Vedler, E., Kõiv, V., Heinaru, A.** (2000). Analysis of the 2,4-dichlorophenoxyacetic aciddegradative plasmid pEST4011 of *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* strain EST4002. *Gene.* 255: 281-288.
- Viggor, S., Juhanson, J., Jõesaar, M., Mitt, M., Truu, J., Vedler, E., Heinaru, A.** (2013). Dynamic changes in the structure of microbial communities in Baltic Sea coastal seawater microcosms modified by crude oil, shale oil or diesel fuel. *Microbiol. Res.* 168: 415-427.
- Viggor, S., Jõesaar, M., Vedler, E., Kiiker, R., Pärnpuu, L., Heinaru, A.** (2015). Occurrence of diverse alkane hydroxylase *alkB* genes in indigenous oil-degrading bacteria of Baltic Sea surface water. *Mar. Pollut. Bull.* 101: 507-516.
- Wang, W. P., Wang, L. P., Shao, Z., Z.** (2010). Diversity and abundance of oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (*alkB*) genes in the subtropical seawater of Xiamen Island. *Microb. Ecol.* 60: 429-439.
- Wang, W., Shao Z.** (2012). Diversity of flavin-binding monooxygenase genes (*almA*) in marine bacteria capable of degradation long-chain alkanes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80: 523-533.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelleteier, D. A., Lane, D. J.** (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
- Weiwei, C., Li, J., Sun, X., Min, J., Hu, X.** (2017). High efficiency degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium *Dietzia* species CN-3. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 118: 110-118.
- Whyte, L. G., Hawari, J., Zhou, E., Bourbonniere, L., Inniss, W. E., Greer, C. W.** (1998) Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low-temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. *Appl Environ Microbiol* 64: 2578–2584.

- Whyte, L. G., Smits, T. H. M., Labbé, D., Witholt, B., Greer, C. W., van Beilen, J. B.** (2002). Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5933-5942.
- Williams, P. A., Sayers, J. R.** (1994). The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegradation.* 5: 195-217.
- Yakimov, M. M., Giuliano, L., Gentile, G., Crisafi, E., Chernikova, T. N., Abraham W. R., Lünsdorf, H., Timmis, K. N., Golyshin, P. N.** (2003). *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 779-785.
- Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., Lang, S., Moore, E. R., Abraham, W. R., Lunsdorf, H., Timmis, K. N.** (1998). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Intern. J. System. Bacteriol.* 48: 339-348.
- Yan, L., Yu, D., Hui, N., Naanuri, E., Viggor, S., Gafarov, A., Sokolov, S. L., Heinaru, A., Romantschuk, M.** (2018). Distribution of archaeal communities along the coast of the Gulf of Finland and their response to oil contamination. *Front. Microbiol.* 9: 15.
- Yen, K. M., Gunsalus, I. C.** (1985). Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7. *J Bacteriol.* 162: 1008–1013.
- Yu, S.H., Ke, L., Wong, Y. S., Tam, N. F.** (2005). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environ. Int.* 31: 149-154.

## **KASUTATUD VEEBIAADRESSID**

<http://www.helcom.fi/about-us>, kasutatud 20.05.2018.

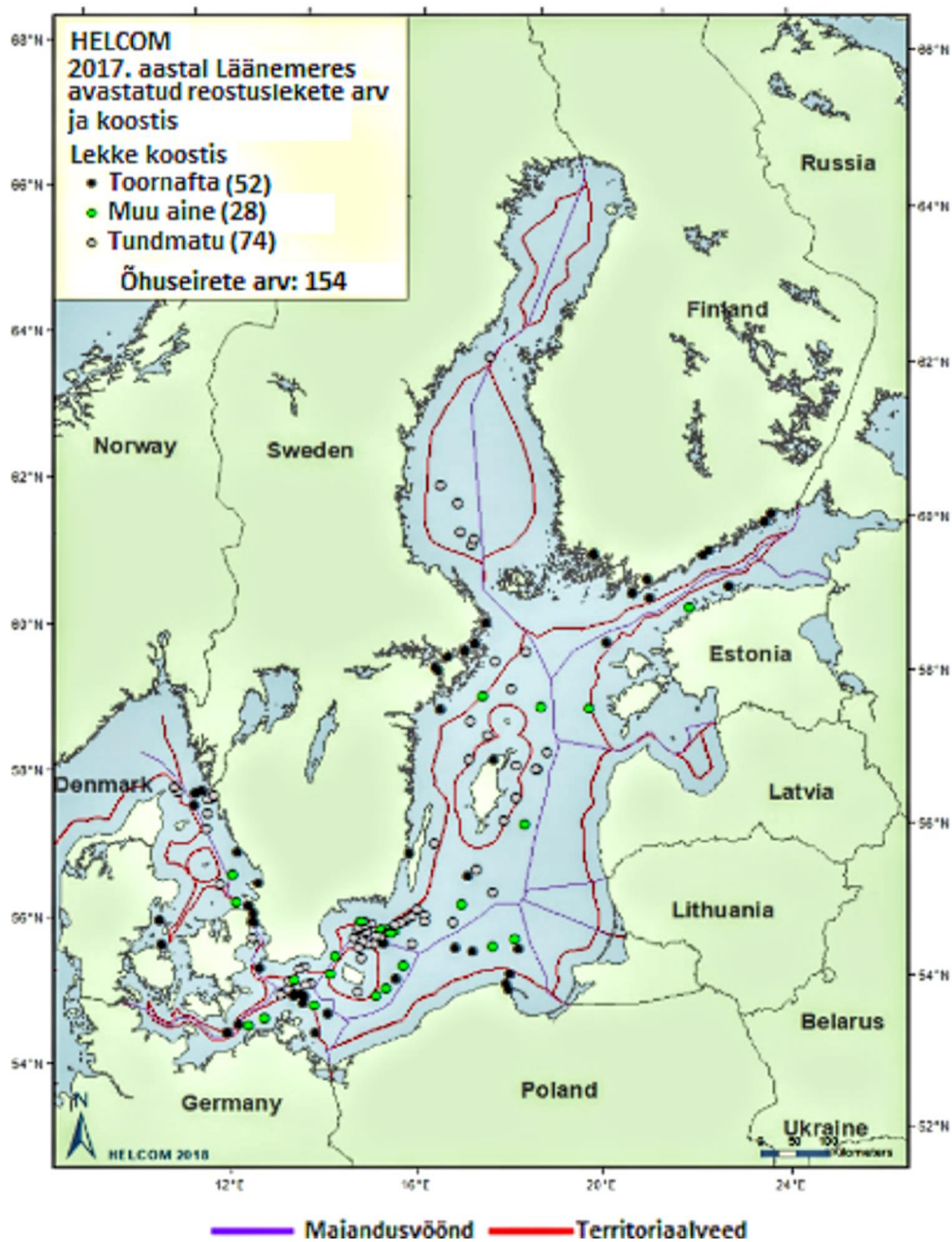
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, kasutatud 20.05.2018.

<http://www.megasoftware.net/>, kasutatud 20.05.2018.

<http://www.ts.ee/tutvustus>, kasutatud 20.05.2018.

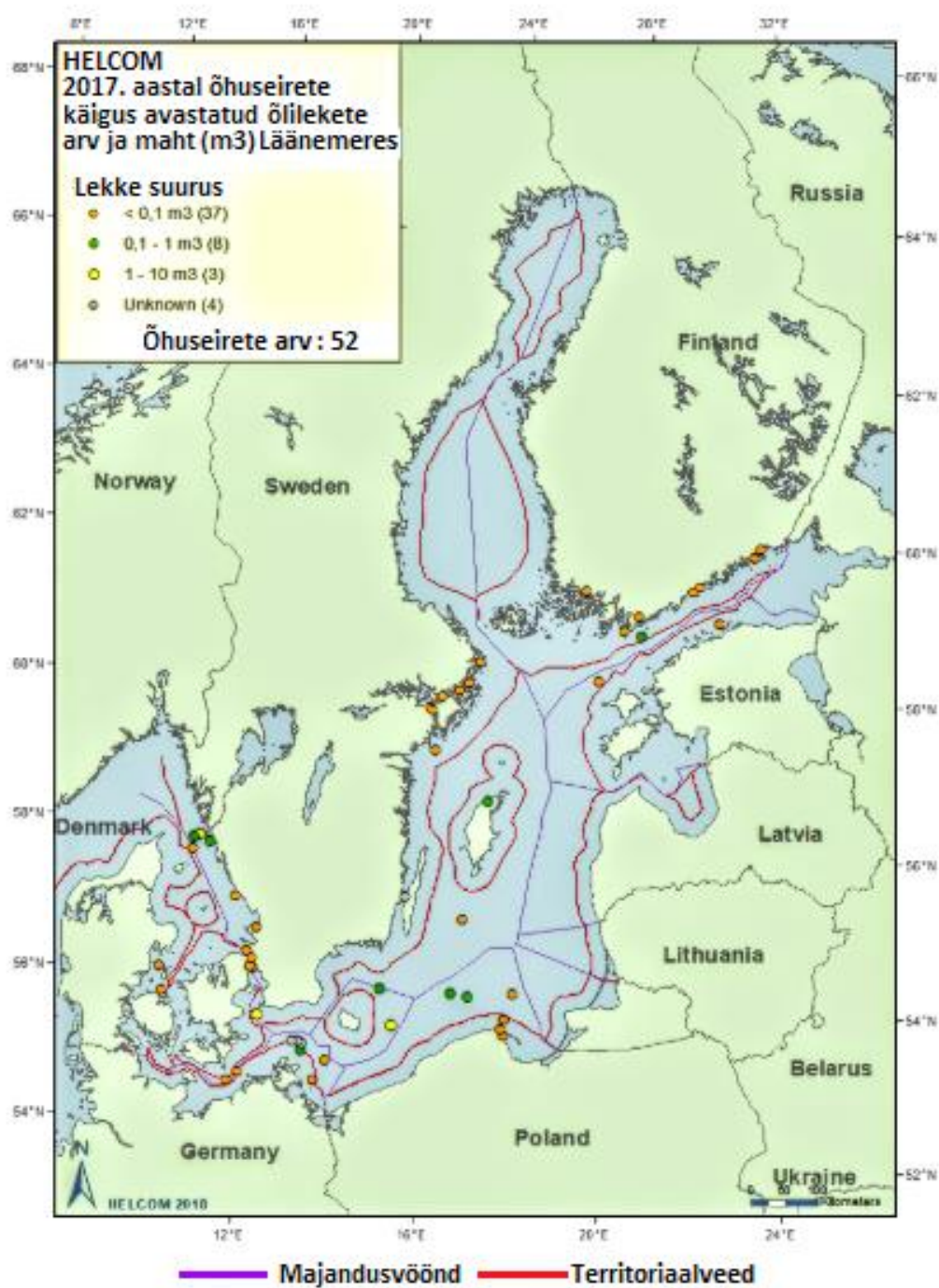
# LISAD

## Lisa 1



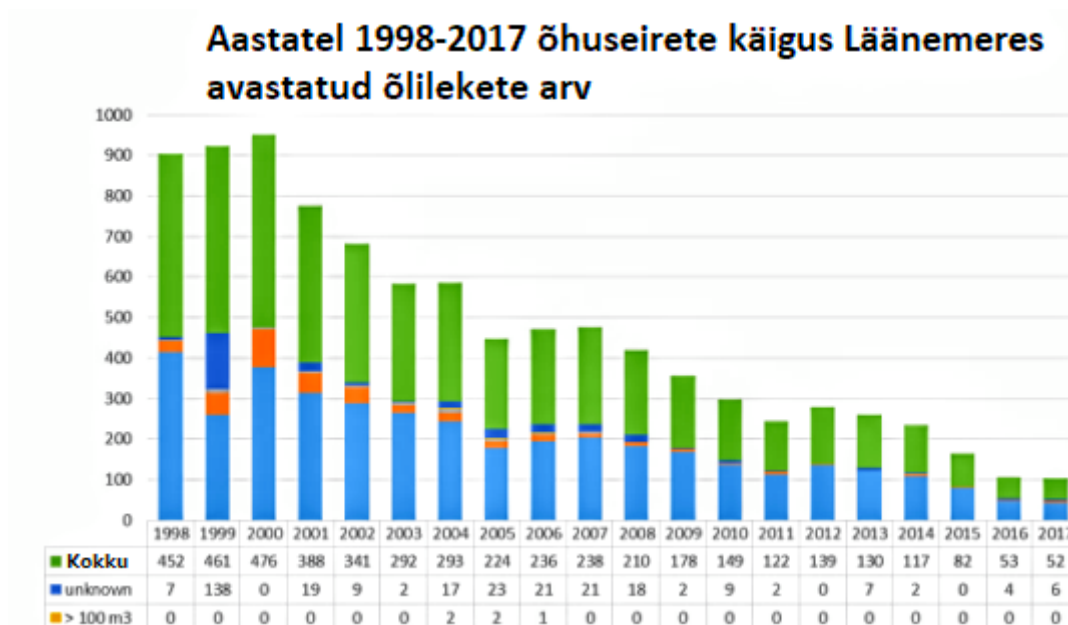
2017. aastal õhuseirete käigus Läänemeres avastatud erinevate reostuste arv ja koostis (HELCOM, 2018).

## Lisa 2



2017. aastal õhuseirete käigus avastatud õlilekete arv ja maht (m<sup>3</sup>) Läänemeres (HELCOM, 2018).

### Lisa 3



Aastatel 1998-2017 õhuseirete käigus Läänemeres avastatud õlilekete arv (HELCOM, 2018).

## Lisa 4A

Isolaatide fenotüüpilised tunnused (kasutatud praimeritega tuvastati kataboolsed geenid).

Tüvi	Isoleerimine			Lähim kultiveeritav organism, 16S rRNA geeni järgi (403-460 ap)	GenBank ID	Identsus (%)	Kasv			
	Proov	O/M	Substraat				SAL	PHE	TOL	Hd
Actinobacteria										
217	3V	O	TN	Rhodococcus fascians	NR037021	97	-	C	-	+++
195	2V	O	SAL	Rhodococcus yunnanensis	NR043009	99	+++	-	-	+++
36	2S	O	PHE	Rhodococcus degradans	NR145886	100	-	++	-	+++
144	4S	O	Hp	Rhodococcus erythropolis	NR037024	98	-	++	-	+++
32	5S	O	TN	Rhodococcus gingshengii	NR043535	98	-	++	-	+++
174	B	O	SAL	Rhodococcus jialingiae	NR115708	98	-	++	-	+++
212	2V	O	Hd	Rhodococcus jialingiae	NR115708	100	-	++	-	+++
241	2V	O	D	Rhodococcus erythropolis	NR119125	98	C	C	C	+++
108	2V	O	TN	Rhodococcus gingshengii	NR043535	100	-	++	-	++
107	3S	O	TN	Mycobacterium setense	NR116291	98	-	C	-	+
29	2V	O	Hd	Williamsia limnetica	NR117925	97	-	C	-	+++
188	5V	M	TN	Aeromicrobium panaciterrae	NR041382	98	-	-	-	C
115	5V	M	TN	Aeromicrobium gingsengisoli	NR041384	98	C	-	C	++
35	1S	O	TN	Dietzia maris	NR116685	99	-	C	-	C
2	4V	O	SAL	Arthrobacter antarcticus	NR115079	99	++	+++	C	C
Alphaproteobacteria										
16	5S	M	TN	Sphingobium hydrophobicum	NR152071	98	++pr	-	C	C
148	5S	M	TN	Sphingobium hydrophobicum	NR152071	99	-	-	+++	-
26	4V	M	TN	Sphingobium xenophagum	NR026304	98	++pr	-	C	C

Tabelis on toodud hõimkondlik kuuluvus, tüve number, proovipunkti tähis, kasvutesti tulemused ning kõige lähimad kultiveeritavad organismid 16S rRNA geeni (403-460 ap) järgi koos GenBank ID numbri ja identsusprotsendiga. Tähistused: 1 - Sillamäe; 2 - Käsmu; 3 - Muuga; 4 - Tallinn; 5 - Vääna; A - Tallinna laht; B - avameri; C - Narva laht. V - rannikuäärne veeproov; S - rannikuäärne sediment; (+++) - väga tugev kasv; (++) - tugev kasv; (+) - kasv; (-) - kasv puudub, pr – biomass värvus pruuniks; O - otsekülv; M - mikrokosm; Hd - heksadekaan; TN - toornafta; NAH - naftaleen; SAL - naatriumsalitsülaad; PHE - fenool; D - diisel; Hp – heptaan; TOL – toluen.



## Lisa 4B

Isolaatide feno- ja genotüüpilised tunnused (kasutatud praimeritega tuvastati kataboolsed geenid) <sup>1</sup>

Tüvi	Isoleerimine			Lähim kultiveeritav organism, 16S rRNA geeni järgi (403- 460 ap)	GenBank ID	Identsus (%)	Kasv			
	Proov	O/M	Substraat				SAL	PHE	TOL	Hd
Gammaproteobacteria										
157	C	O	PHE	Acinetobacter kyonggiensis	NR116714	99	-	+++	nd	C
67	C	O	NAH	Acinetobacter kyonggiensis	NR116714	99	C	+++	nd	C
165	C	O	PHE	Acinetobacter kyonggiensis	NR116714	99	-	++	nd	++
192	4S	O	PHE	Acinetobacter baumannii	NR117677	98	+++	+++	nd	++
179	3S	O	TN	Acinetobacter lwoffii	NR113346	98	-	+	-	+++
235	3V	O	PHE	Acinetobacter baumannii	NR117677	98	-	-	-	C
216	5S	M	TN	Acinetobacter junii	NR117623	99	+++	+++	-	C
57	3V	O	NAH	Pseudomonas fluorescens	NR113647	99	-	-	-	C
83	1S	O	D	Pseudomonas veronii	NR112075	100	-	-	-	C
167	B	M	TN	Pseudomonas veronii	NR112075	100	-	-	+++	C
238	B	O	SAL	Pseudomonas fluorescens	NR113647	99	-	-	-	C
84	A	O	D	Pseudomonas putida	NR113651	98	-	-	-	++
54	2V	O	NAH	Pseudomonas marginalis	NR112072	100	-	-	-	C
74	A	O	D	Pseudomonas marginalis	NR112072	100	-	-	-	C
76	3S	O	Hd	Pseudomonas migulae	NR114223	99	-	-	-	C
160	1V	O	TN	Pseudomonas meridiana	NR025587	99	-	-	-	C
171	3V	O	PHE	Pseudomonas marginalis	NR112072	100	-	-	-	C
176	3V	O	SAL	Pseudomonas marginalis	NR112072	100	-	-	-	C
184	2S	O	SAL	Pseudomonas trivialis	NR028987	100	++	-	-	C
189	A	O	NAH	Pseudomonas miguale	NR114223	99	-	-	-	C
180	5V	M	TN	Pseudomonas veronii	NR112075	100	-	C	+++	C
201	5V	M	TN	Pseudomonas synxantha	NR113583	100	-	C	+++	C
131	1V	O	SAL	Pseudomonas meridiana	NR025587	99	++	+++	-	C
137	3V	O	PHE	Pseudomonas antarctica	NR025586	100	++	+++	+++	C
1	A	O	PHE	Pseudomonas cedrina	NR042147	100	C	+++	-	C
40	5S	O	PHE	Pseudomonas fluorescens	NR113647	99	+++	+++	-	C
18	5S	M	TN	Pseudomonas mandelii	NR114216	100	++	+++	-	C
4	B	O	PHE	Pseudomonas guineae	NR042607	100	-	++	-	+
202	C	O	PHE	Pseudomonas xanthomarina	NR041044	99	-	+++	+	C
92	4V	M	TN	Pseudomonas guineae	NR042607	100	-	-	+	+++
234	4V	M	TN	Pseudomonas syringae	NR074597	100	+	+	++	C

<sup>1</sup>- Kasutatud lühendid on toodud Lisas 4A.



## Lisa 5A

Isolaatide feno- ja genotüüpilised tunnused (kasutatud praimeritega kataboolseid geene ei tuvastatud)<sup>1</sup>

Tüvi	Isoleerimine			Lähim kultiveeritav organism, 16S rRNA geeni järgi (403-460 ap)	GenBank ID	Identsus (%)	Kasv			
	Proov	O/M	Substraat				SAL	PHE	TOL	Hd
Actinobacteria										
136	4V	O	PHE	Arthrobacter antarcticus	NR115079	99	+	+++	-	C
58	4S	O	Hd	Arthrobacter oryzae	NR041545	99	C	++	-	C
49	4V	O	D	Arthrobacter oxydans	NR026236	99	C	C	C	+
141	1S	O	NAH	Arthrobacter psychrochitiniphilus	NR104702	98	++	+	C	C
162	C	O	SAL	Microbacterium oleoivorans	NR042262	97	C	++	C	C
134	4V	O	SAL	Microbacterium thalassium	NR042481	98	C	C	+	C
53	4S	O	D	Micrococcus luteus	NR075062	99	+++	++	+	C
Alphaproteobacteria										
132	2V	O	SAL	Agrobacterium fabrum	NR074266	100	++	+++	-	C
38	C	O	PHE	Brevundimonas vesicularis	NR113586	98	+++	+++	+++	C
59	3S	O	Hd	Methylobacterium extorquens	NR112230	100	+++	+++	-	C
52	4V	O	D	Methylobacterium fujisawaense	NR025374	100	-	++	-	C
Bacteroidetes										
111	3V	O	Hd	Flavobacterium hercynium	NR042520	98	-	-	-	++
25	1S	O	PHE	Flavobacterium piscis	NR133746	98	-	-	-	++
Betaproteobacteria										
128	5V	O	SAL	Comamonas phosphati	NR147778	96	++	-	-	+++
205	C	M	TN	Variovorax ginsengisoli	NR112562	99	++	C	-	C
Deinococcus-Thermus										
69	A	O	TN	Deinococcus seoulensis	NR146689	99	-	++	-	C
Firmicutes										
166	3S	O	TN	Exiguobacterium oxidotolerans	NR024812	99	+	C	C	C

<sup>1</sup>- Kasutatud lühendid on toodud Lisas 4A.

## Lisa 5B

Isolaatide feno- ja genotüüpilised tunnused (kasutatud praimeritega kataboolseid geene ei tuvastatud)<sup>1</sup>

Tüvi	Isoleerimine			Lähim kultiveeritav organism, 16S rRNA geeni järgi (403-460 ap)	GenBank ID	Identsus (%)	Kasv			
	Proov	O/M	Substraat				SAL	PHE	TOL	Hd
Gammaproteobacteria										
71	A	O	SAL	<i>Aeromonas salmonicida</i>	NR113635	100	+	++	-	C
56	3V	O	NAH	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	NR118225	99	++	++	-	C
172	A	O	SAL	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>	NR117022	100	+++	C	-	C
43	2V	O	Hp	<i>Pseudomonas asturiensis</i>	NR108461	100	+++	+++	-	C
37	A	O	PHE	<i>Pseudomonas asturiensis</i>	NR108461	100	+	+	-	C
219	1V	O	SAL	<i>Pseudomonas austeriensis</i>	NR108461	100	+	C	-	C
239	5V	O	SAL	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NR113647	99	++	C	-	C
228	2V	O	NAH	<i>Pseudomonas guineae</i>	NR042607	100	-	-	-	++
85	A	O	Hd	<i>Pseudomonas guineae</i>	NR042607	99	-	-	-	+++
98	2V	O	Hd	<i>Pseudomonas guineae</i>	NR042607	99	-	-	-	+++
94	4V	M	TN	<i>Pseudomonas guineae</i>	NR042607	100	-	-	-	+
191	5V	M	TN	<i>Pseudomonas guineae</i>	NR042607	99	-	-	-	+++
199	5V	M	TN	<i>Pseudomonas guineae</i>	NR042607	99	-	-	-	+++
101	5V	O	Hd	<i>Pseudomonas guineae</i>	NR042607	100	-	-	-	+++
168	A	O	SAL	<i>Pseudomonas koreensis</i>	NR025228	99	+	C	-	+
156	A	O	D	<i>Pseudomonas marincola</i>	NR117186	99	++	-	-	-
24	5S	O	Hp	<i>Pseudomonas migulae</i>	NR114223	100	+++	+++	-	C
152	C	M	TN	<i>Pseudomonas punonensis</i>	NR109583	99	C	+	-	C
198	C	O	SAL	<i>Pseudomonas putida</i>	NR113651	99	+++	C	-	C
153	4V	M	TN	<i>Pseudomonas taeanensis</i>	NR116651	99	-	++	C	+++
214	A	O	D	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	NR116172	99	+++	+++	-	C
200	C	O	SAL	<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	NR041044	99	-	C	-	+
242	C	O	PHE	<i>Pseudomonas xsanthomarina</i>	NR041044	99	-	-	-	C
109	5S	O	TN	<i>Shewanella baltica</i>	NR025267	99	+++	C	C+	++
31	5S	O	TN	<i>Shewanella baltica</i>	NR025267	99	-	+	-	C

<sup>1</sup>- Kasutatud lühendid on toodud Lisas 4A.

## Lisa 6

Isoleeritud tüvede AlkB, LmPH ja C23O ennustatavate aminohappeliste järjestuste võrdlemisel GenBank andmebaasist saadud lähimad vasted

Tüvi	AlkB homolooge	Lähim kultiveeritav organism AlkB järgi (101-106 ah)	GenBank ID	Identsus (%)	Lähim kultiveeritav organism LmPH järgi (173 ah)	GenBank ID	Identsus (%)	Lähim kultiveeritav organism C23O järgi (263-270 ah; halliga tähistatud)	GenBank ID	Identsus (%)
57	1	<i>P. fluorescens</i>	AKP07098	91						
83	1	<i>P. fluorescens</i>	AKP07062	100						
167	1	<i>P. fluorescens</i>	AKP07061	98						
238	1	<i>P. fluorescens</i>	AKP07066	99						
84	1	<i>P. putida</i>	AKP07101	98						
54	1	<i>Pseudomonas sp.</i>	ADA71114	100						
74	1	<i>Pseudomonas sp.</i>	ADA71114	100						
76	1	<i>Pseudomonas sp.</i>	ADA71100	100						
160	1	<i>Pseudomonas sp.</i>	ADA71128	99						
171	1	<i>Pseudomonas sp.</i>	ADA71095	100						
176	1	<i>Pseudomonas sp.</i>	ADA71095	99						
184	1	<i>Pseudomonas sp.</i>	ADA71128	100						
189	1	<i>Pseudomonas sp.</i>	ADA71098	100						
180	1	<i>P. fluorescens</i>	AKP07062	100				<i>P. migulae</i>	AFS60529	100
201	1	<i>Pseudomonas sp.</i>	ADA71106	100				<i>Pseudomonas sp.</i>	AGI56843	100
131	1	<i>Pseudomonas sp.</i>	WP100943344	90	<i>P. putida</i>	AAW66703	99			
137	1	<i>P. protegens</i>	AKP07087	88	<i>P. putida</i>	AAW66703	99			
1					<i>Pseudomonas sp.</i>	AFS60606	100			
40					<i>P. putida</i>	AAW66703	100			
18					<i>P. putida</i>	AAW66703	100			
4					<i>P. mendocina</i>	AAW66691	100	<i>P. mendocina</i>	AAW81667	100
202					<i>P. mendocina</i>	AAW66694	100	<i>P. putida</i>	BAE44409	96
92								<i>P. stutzeri</i>	AFS60532	100
234								<i>P. migulae</i>	AFS60529	100
16								<i>Sphingomonas sp.</i>	AAD11448	99
26								<i>Sphingomonas sp.</i>	AAD11448	99
148										

Tabelis on märgitud tüve number, AlkB homoloogide arv, lähim kultiveeritav organism võrreldud valgusjärjestuse põhjal GenBank andmebaasis ning vastava tüve GenBank ID number ja identsusprotsent. Halliga tähistatud lahtrid märgivad tüvesid, kelle biomass pritsimisel katehooliga tuvastati värvusreaktsioon, mis on iseloomulik C23O aktiivsusele.

## Lisa 7

Isoleeritud tüvede AlkB, LmPH ja C23O ennustatavate aminohappeliste järjestuste võrdlemisel GenBank andmebaasist saadud lähimad vasted

Tüvi	AlkB homoloog	Lähim kultiveeritav organism AlkB järgi (101-106 ah)	GenBank ID	Identsus (%)	Lähim kultiveeritav organism LmPH järgi (173 ah)	GenBank ID	Identsus (%)	Lähim kultiveeritav organism C12O (151-189 ah) järgi	GenBank ID	Identsus (%)
217	1	<i>Rhodococcus sp.</i>	KQU53855	94						
	2	<i>R. fascians</i>	WP037172464	98						
	3	<i>Rhodococcus sp.</i>	ACR56750	97						
195	1	<i>Rhodococcus sp.</i>	AKP07051	75						
	2	<i>R. sovatisensis</i>	AML79720	86						
	3	<i>Rhodococcus sp.</i>	WP084345768	90						
36	1	<i>R. gingshengii</i>	CDI44596	97	<i>R. erythropolis</i>	WP020909387	100	<i>R. gingshengii</i>	WP083056447	100
	2	<i>Rhodococcus sp.</i>	AGC27138	100						
	3	<i>R. erythropolis</i>	BAG06232	99						
144	1	<i>Rhodococcus sp.</i>	AGC27138	100	nd			<i>Rhodococcus sp.</i>	WP080909840	99
	2	<i>Rhodococcus sp.</i>	AHEY77899	100						
	3	<i>R. gingshengii</i>	CDI44591	100						
32	1	<i>Rhodococcus sp.</i>	AGC27138	100	<i>R. erythropolis</i>	WP020909387	100	<i>Rhodococcus sp.</i>	WP080909840	99
	2	<i>Rhodococcus sp.</i>	AHEY77899	100						
	3	<i>Rhodococcus sp.</i>	ABJ16481	100						
174	1	<i>Rhodococcus sp.</i>	AGC27138	99	<i>R. erythropolis</i>	WP020909387	99	<i>Rhodococcus sp.</i>	WP080909840	99
	2	<i>Rhodococcus sp.</i>	AJE25655	99						
	3	<i>Rhodococcus sp.</i>	AHEY77899	100						
212	1	<i>Rhodococcus sp.</i>	AGC27138	100	<i>R. erythropolis</i>	WP020909387	100	<i>R. gingshengii</i>	WP083056447	100
	2	<i>Rhodococcus sp.</i>	AHEY77899	99						
	3	<i>Rhodococcus sp.</i>	AJE25655	99						
	4	<i>Rhodococcus sp.</i>	ABJ16481	100						
241	1	<i>Rhodococcus sp.</i>	AGC27134	100	<i>R. erythropolis</i>	WP020909387	100	<i>R. gingshengii</i>	WP083056447	99
	2	<i>Rhodococcus sp.</i>	AHEY77865	99						
	3	<i>Rhodococcus sp.</i>	ABJ16481	100						
	4	<i>Rhodococcus sp.</i>	AGC27138	100						
108	1	<i>R. erythropolis</i>	BAG06234	98	<i>R. erythropolis</i>	WP020909387	100	<i>R. gingshengii</i>	WP083056447	100
	2	<i>Rhodococcus sp.</i>	AGC27138	100						
	3	<i>R. erythropolis</i>	BAG06235	100						
	4	<i>Rhodococcus sp.</i>	ABJ16481	100						
	5	<i>Rhodococcus sp.</i>	AHEY77902	100						
107	1	<i>Mycobacterium sp.</i>	WP105366145	96						
29	1	<i>Williamsia sp.</i>	WP084835456	95						
188	1	<i>Aeromicrobium sp.</i>	WP108577032	93						
155	1	<i>Aeromicrobium sp.</i>	WP108577033	93						
35	1	<i>Dietzia sp.</i>	ACR56752	85				<i>D. cinnamea</i>	WP007628974	92
2					<i>Arthrobacter sp.</i>	WP105649967	99			

Tabelis on märgitud tüve number, AlkB homoloogi järjekorra number, lähim kultiveeritav organism võrreldud valgusjärjestuse põhjal GenBank andmebaasis ning vastava tüve GenBank ID number ja identsusprotsent.

## Lisa 8

Isoleeritud tüvede AlkM, AlmaA, LmPH ja C12O ennustatavate aminohappeliste järjestuste võrdlemisel GenBank andmebaasist saadud lähimad vasted

Tüvi	Lähim kultiveeritav organism AlkM järgi (101-106 ah)	GenBank ID	Identsus (%)	Lähim kultiveeritav organism AlmaA järgi (209-210 ah)	GenBank ID	Identsus (%)	Lähim kultiveeritav organism LmPH järgi (173 ah)	GenBank ID	Identsus (%)	Lähim kultiveeritav organism C12O järgi (151-189 ah)	GenBank ID	Identsus (%)
157	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP086166382	99	<i>Acinetobacter kyonggiensis</i>	WP092692380	99	<i>Acinetobacter sp.</i>	AFS60621	100	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP086185313	100
67	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP086166382	99	<i>Acinetobacter kyonggiensis</i>	WP092692380	99	<i>Acinetobacter sp.</i>	AFS60621	100	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP086185313	100
165	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP086166382	99	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP086184231	99	<i>Acinetobacter sp.</i>	AFS60621	100	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP086185313	100
192	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP067722776	97	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP086194660	97	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP005172219	99	nd		
179	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP067867362	96	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP086194660	94				<i>A. bohemius</i>	WP004649107	95
235	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP067722776	97	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP086194660	97						
216				<i>Acinetobacter bohemius</i>	WP074946194	100						

Tabelis on märgitud tüve number, lähim kultiveeritav organism võrreldud valgujärjestuse põhjal GenBank andmebaasis ning vastava tüve GenBank ID number ja identsusprotsent.



## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Kevin Liivapuu

(sünnikuupäev: 30.11.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Läänemere pinnavee ja setete mikroobide mitmekesisus külmal perioodil: naftasaaduste lagundamise kataboolne potentsiaal, mille juhendaja on Signe Viggor,
  - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2018